

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zu  
2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen in  
*Equisetum arvense* L. und *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman &  
A.W. Hill**



**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Miriam Bredebach geb. Hundt  
aus Olpe

Marburg an der Lahn 2013

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. U. Matern

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. M. Petersen

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2013

**Teile dieser Arbeit wurde in den folgenden Beiträgen veröffentlicht:**

**Vorträge:**

Bredebach, M., Matern, U. and Martens, S.

“Biochemical characterization of flavone biosynthesis in *Equisetum arvense* L.”

6. Kurt Mothes Workshop, Jena, 2008

Bredebach, M., Matern, U. und Martens, S.

“Flavonoid- and protoflavonoid biosynthesis in *Equisetum arvense* L.”

6. Treffen der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deut. Bot. Gesellschaft, Fulda, 2009

**Posterpräsentationen:**

Hundt, M., von Thülen, A., Matern U. and Martens S.

“Biochemical characterization of flavone biosynthesis in *Equisetum arvense*”

Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung Hamburg, 2007.

Bredebach, M., Matern, U. and Martens, S.

“Flavone synthesis in primitive plants: FNS- and FNS-like enzyme reactions“

XXIVth International Conference on Polyphenols, Salamanca, Spanien, 2008

Bredebach, M., Matern U. and Martens S.

“Stress-experiments with *Petroselinum crispum* – how parsley gets red“

Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung Leipzig, 2009.

**Publikationen:**

Bredebach, M., Matern, U. and Martens, S.

“Three 2-oxoglutarat-dependent dioxygenase activities of *Equisetum arvense* L. forming flavone and flavonol from (2S)-naringenin” (2011). *Phytochemistry* 72, 557-563.

Bredebach, M., Matern, U. and Martens, S.

“Anthocyanidin synthase from *Petroselinum crispum* – how parsley gets red”. in Vorbereitung

Diese Arbeit wurde am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. U. Matern und Herrn Dr. S. Martens

im Zeitraum vom 01.01.2007 bis 31.03.2010 durchgeführt.

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Matern danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis sowie die wertvolle Diskussion und Unterstützung. Insbesondere danke ich Ihm für die gute Betreuung und Unterstützung bei der Verschriftlichung der Arbeit

Ich danke Herrn Dr. Stefan Martens für die gute Betreuung und die Möglichkeit unterschiedliche Arbeitsmethoden kennenzulernen.

Frau Prof. Dr. Petersen möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur und ihre hochgeschätzte Unterstützung sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und die Nutzung des Zellkulturbereiches danken.

Herr Prof. Dr. Gerhard Kost danke ich für die Unterstützung durch die Perspektive erweiternden Gespräche im Rahmen von SciMento.

Bei Domenico Masuero and Mattia Gasperotti (Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario di San Michele all'Adige – IASMA) bedanke ich mich für die Durchführung der UPLC-MS-Analysen.

Dr. Tobias Craan (AG Prof. Dr. Klebe, Marburg) danke ich für die Unterstützung zur Erstellung und Interpretation des Homologiemodells der ANS aus Petersilie.

Dr. Marion Sander möchte ich besonders danken für ihre gutes Zuhören und die Anteilnahme bei allerlei größeren und kleineren Problemen. Zudem danke ich ihr für die kleinen Teepausen, um kurz dem Stress zu entfliehen.



Dr. Sabine Schmidt gilt ein besonderer Dank für die Unterstützung und ihre Loyalität sowie das gegenseitige Aufmuntern mit Durchhalteparolen vor allem im letzten Abschnitt.

Ein besonderer Dank gilt auch der „Donnerstag-Abend-Fraktion“, Johannes Benner, Dr. Patrick Bredebach, Dr. Joachim Hans, Dr. Britta Rohde und Dr. Marion Sander, für die intensiven, abwechslungsreichen und entspannenden abendlichen Runden.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für das gute Arbeitsklima, die gute Möglichkeit der Absprachen und des Aushelfens bedanken und insbesondere Herrn Rudl für die Anzucht des Pflanzenmaterials und Zusammenstellung verschieden nährstoffhaltiger Böden danken.

Ich danke auch Frau Dr. Ann-Katrin Gräfe-Bub und dem gesamten Team der Schloss-Apotheke Siegen für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit im außeruniversitären Bereich.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, meinen Eltern, Geschwistern und der ganzen Familie für die geduldige Begleitung durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit und die aufbauenden Worte sowie aufrüttelnde Stöße zur rechten Zeit.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.	Flavonoide	1
1.1.	Bedeutung von Flavonoiden für Pflanzen	1
1.2.	Flavonoidbiosynthese	4
1.3.	Stressinduzierte Flavonoidbiosynthese in Pflanzen	6
1.4.	Pharmazeutische Bedeutung von Flavonoiden	8
2.	<i>Equisetum arvense</i> und <i>Petroselinum crispum</i>	10
2.1.	<i>E. arvense</i>	10
2.2.	<i>P. crispum</i>	13
3.	Therapeutischer Nutzen von <i>E. arvense</i> und <i>P. crispum</i>	15
3.1.	Therapeutischer Nutzen von <i>E. arvense</i>	15
3.2.	Therapeutischer Nutzen von <i>P. crispum</i>	15
4.	2-ODDn in Pflanzen	16
4.1.	Bedeutung von 2-ODDn	16
4.2.	Sequenzhomologie und Evolution der 2-ODDn	18
4.3.	Reaktionsmechanismus von 2-ODDn	20
<b>II.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>III.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	24
1.1.	Radiochemikalien	25
1.2.	Enzyme	25
1.3.	Reagenziensätze (Kits)	26
1.4.	Substrate, Kosubstrate und Referenzsubstanzen	26
2.	Lösungen, Puffer und Medien	26
2.1.	Lösungen für die Bakterientransformation	26
2.2.	Puffer für die Isolierung von Plasmid DNA	27
2.3.	Lösungen für die Isolierung von genomischer DNA	27
2.4.	Lösungen für die Isolierung von Gesamt-RNA nach Chomczynski und Sacchi (1987)	27
2.5.	Puffer für den Bakterien- bzw. Hefeaufschluss	27
2.6.	Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.7.	Puffer für Western Blot	28
2.8.	Puffer für die Proteinreinigung	29
2.9.	Puffer und Lösungen für das cDNA-Bank Screening	30
2.10.	Sonstige Puffer und Lösungen	30
2.11.	Hefemedien	30
2.12.	Bakterienmedien	31
2.13.	Medien für das cDNA-Bank Screening	31
2.14.	In Medien verwendete Antibiotika	31
2.15.	Pflanzenmedien	32
3.	Bakterien- und Hefestämme	33
4.	Vektoren	33
4.1.	Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten	33
4.2.	Vektoren für die Klonierung in <i>Enterobacteria phage lambda</i>	33
4.3.	Vektoren für die Expression in <i>E. coli</i>	34
4.4.	Vektoren für die Expression in <i>S. cerevisiae</i>	34
5.	Geräte	34
6.	Gewinnung des Pflanzenmaterials	35

7.	Stressversuche an <i>P. crispum</i>	36
8.	Chemische Methoden	36
8.1.	Extraktion und Analyse von Flavonoiden aus Pflanzen	36
8.2.	Dünnschichtchromatographie (DC)	37
8.3.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	38
8.4.	Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie (UPLC-MS)	38
9.	Molekularbiologische Methoden	39
9.1.	Oligonucleotid-Primer	39
9.2.	Agarose-Gelelektrophorese	39
9.3.	Gesamt-RNA	40
9.4.	cDNA-Bank	40
9.4.1.	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	41
9.4.2.	Titerbestimmung	42
9.4.3.	Screening	42
9.5.	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
9.6.	3'/5'-RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends)	45
9.7.	Ligation	46
9.8.	Restriktionsverdau	48
9.9.	Transformation	48
9.10.	Heterologe Expression	49
9.10.1.	Expression in <i>E. coli</i>	49
9.10.2.	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	50
9.11.	Isolierung der genomischen DNA	50
9.12.	Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien	51
9.13.	DNA- und Polypeptid-Sequenzanalyse	52
9.14.	Glycerindauerkulturen	52
10.	Biochemische Methoden	52
10.1.	Synthese von <sup>14</sup> C markierten Substraten	52
10.2.	Synthese von Leucopelargonidin und Leucocyanidin	53
10.3.	Extraktion löslicher Enzyme	53
10.4.	Enzymtest	54
10.4.1.	Standardenzymtests	54
10.4.2.	Hemmtests	56
10.5.	Biotransformation	56
10.6.	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	56
10.7.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
10.8.	Western-Blot	57
10.9.	Proteinreinigung	59
10.9.1.	Affinitätsreinigung an Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	59
10.9.2.	Enzymreinigung	60
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse <i>E. arvense</i></b>	<b>63</b>
1.	Enzyme aus <i>E. arvense</i>	63
1.1.	Enzymaktivität	63
1.2.	Substratspezifitätstests	65
1.3.	Hitzenaturierung	66
1.4.	Enzymstabilität	67
1.5.	Produktanalyse	68
1.5.1.	DC	68
1.5.2.	HPLC	70

1.5.3.	UPLC-MS	71
1.6.	Abhängigkeit von Kofaktoren	71
1.7.	Hemmversuche	72
2.	Klonierung und Expression einer 2-ODD aus <i>Equisetum</i> ( <i>EaODD1</i> )	73
2.1.	cDNA-Klonierung	73
2.2.	Expression von <i>EaODD1</i> in Hefe	75
2.3.	Nachweis rekombinanter <i>EaODD1</i> durch SDS-PAGE und Western-Blot	76
2.4.	Expression in Bakterien	78
2.5.	Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE	78
3.	Enzym-Reinigung	79
3.1.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	79
3.2.	Reinigung durch HIC	80
3.3.	Reinigung durch SEC	81
3.4.	Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie	81
3.5.	Affinitäts-Chromatographie	82
4.	Klonierung aus einer cDNA-Bank	86
4.1.	Screening einer cDNA-Bank in Phagen	86
4.2.	Methoden-Kontrolle mit homologer CHS-cDNA ( <i>EaCHS</i> )	86
4.3.	Screening mit verschiedenen 2-ODDn	88
4.4.	Klonierung einer 2-ODD aus <i>E. arvense</i> ( <i>EaODD2</i> )	91
4.5.	Expression in Hefe	92
4.6.	Expression in Bakterien	93
4.7.	Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE	94
5.	Sequenzanalyse	95
5.1.	Vergleich der cDNA-Sequenzen <i>EaODD1</i> und <i>EaODD2</i>	95
5.2.	Konservierte Aminosäuren in 2-ODDn	95
5.3.	gDNA-Sequenzvergleiche	97
5.4.	Phylogenetische Analyse	98
<b>V.</b>	<b>Ergebnisse – <i>P. crispum</i></b>	<b>101</b>
1.	Stressexperimente	101
1.1.	Physiologie	101
1.2.	Inhaltsstoffe	102
2.	Klonierung und Expression einer putativen ANS aus <i>Petroselinum crispum</i> ( <i>PcANS</i> )	104
2.1.	Klonierung	104
2.2.	Expression in Bakterien	108
2.3.	Expressionskontrolle	110
2.4.	Expression in Hefe	113
2.5.	Expressionskontrolle	114
3.	Expressionsanalyse im Pflanzengewebe	115
4.	gDNA-Sequenz-Analyse der ANS aus Petersilie	117
5.	Proteinanalyse	118
5.1.	Vergleich der konservierten Aminosäuren	118
5.2.	Struktur-Modeling der ANS aus Petersilie	120
6.	Phylogenetische Analyse	123
<b>VI.</b>	<b>Diskussion – <i>E. arvense</i></b>	<b>125</b>
1.	Einordnung der katalytischen Dioxygenase-Aktivitäten in <i>E. arvense</i>	125
2.	Stabilität der Enzymaktivität im Pflanzenextrakt	130
3.	Versuche zur Enzymreinigung	130
4.	Rekombinante Proteine	134

<b>VII.</b>	<b>Diskussion – <i>P. crispum</i></b>	<b>136</b>
1.	Zuordnung des stressinduzierten Farbstoffes in <i>P. crispum</i>	136
2.	Rekombinante Expression	137
3.	Molekulargenetische Analyse der klonierten Sequenz	138
4.	Semi-quantitative PCR	140
5.	Vorteil der Bildung von Anthocyanen	141
<b>VIII.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>142</b>
<b>IX.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>144</b>
<b>X.</b>	<b>Anhang</b>	<b>158</b>
1.	HPLC-Analytik zum Enzymtest <i>E. arvense</i>	158
2.	UPLC-MS-Daten zum Enzymtest <i>E. arvense</i>	159
3.	Vektorkarten der Plasmide	162
3.1.	pET 15b (Novagen)	162
3.2.	pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen)	163
3.3.	pCR 8 GW/TOPO TA (Invitrogen)	163
3.4.	pDEST 14 (Invitrogen)	164
3.5.	pDEST 17 (Invitrogen)	164
3.6.	pQE 70 (Qiagen)	165
3.7.	pET Duet-1 (Novagen)	166
3.8.	pYES 2.1 TOPO TA (Invitrogen)	166
3.9.	pYES 2 (Invitrogen)	167
3.10.	pYES-DEST 52 (Invitrogen)	167
4.	Klonierte cDNA-Sequenzen und translatierte Aminosäure-Sequenzen	168
5.	Verwendete Oligonucleotide	171
6.	Quellen und Accession-Nr. der verwendeten Aminosäure-Sequenzen in den Phylogenie-Analysen	173

## Abkürzungen

$\alpha$ -KIC	$\alpha$ -Ketoisocaproat
$\alpha$ -KICD	$\alpha$ -Ketoisocaproatdioxygenase
2-ODD	2-Oxoglutaratabhängige Dioxygenase
2,4-PDC	2,4-Pyridindicarboxylat
4CL	4-Coumarat:Coenzym A-Ligase
4-HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
4-HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylat
ACCO	1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-oxidase
ACCS	1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-synthase
Amp	Ampicillin
Ancy	Ancymidol
ANS	Anthocyanidinsynthase
Ap	Apigenin
BAW	Butanol Essigsäure Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C4H	Zimtsäure-4-hydroxylase
CAW	Chloroform Essigsäure Wasser
cDNA	CopyDNA
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
Cy	Cyanidin
Cyt C	Cytochrom C
D4H	Desacetoxyvindolin-4-hydroxylase
DAD	Diodenarray-Detektor
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-Anion
DEDC	Diethyldithiocarbamat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-reduktase
d. h.	das heißt
DHK	Dihydrokämpferol
DHQ	Dihydroquercetin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFE	Ethylene forming enzyme = ACCO
ERI	Eriodictyol

F3'H	Flavonoid-3'-hydroxylase
F <sub>c</sub>	kristallisierbarer Bereich des Antikörpers (konstant)
FHT	Flavanon-3 $\beta$ -hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS	Flavonsynthase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gravitationskonstante
GA	Gibberellinsäure
gDNA	Genomische DNA
g	Gramm
GTE	Glukose-Tris-HCl-EDTA-Puffer
h	Stunde
H6H	Hyoscyamin-6 $\beta$ -hydroxylase
HDL	High-density Lipoprotein
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPNS	Isopenicillin-N-synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
KAc	Kaliumacetatlösung
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
Keto	Ketoconazol
K <sub>m</sub>	Kämpferol
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie
LCy	Leukocyanidin
LDL	Low-density Lipoprotein
LPg	Leukopelargonidin
Lu	Luteolin
M	Molar
Me <sup>2+</sup>	Zweiwertige Metallionen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	BotenRNA
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
N	Normalität
NaAc	Natriumacetatlösung
NADPH	Reduziertes Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NAR	Naringenin
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol

NTA	Nitrilotriessigsäure-Agarose
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
P4H	Prolyl-4-hydroxylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque forming unit
Pg	Pelargonidin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pyr	Pyruvat
Qu	Quercetin
RACE-PCR	Schnelle cDNA-Enden-Amplifizierung mittels PCR
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (DC)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
SALH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosin-L-Methionin
SC-U	Hefeselektionsmedium ohne Uracil
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEC	Größenausschlusschromatographie
TAE	Tris-HCl-Essigsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetcyclacis
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
u. a.	unter anderem
UPLC-MS	Ultradruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumenprozent
W/V	Gewichtsprozent
YPGE	Hefeextrakt-Pepton-Glukose-Ethanol-Medium
z. B.	zum Beispiel



## Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

# **I. Einleitung**

## **1. Flavonoide**

### **1.1. Bedeutung von Flavonoiden für Pflanzen**

Flavonoide sind weit verbreitete Vertreter der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (Schijlen et al., 2004). Sie können sowohl in höheren Blütenpflanzen als auch in Farnen und Moosen nachgewiesen werden. Ihre weite Verbreitung lässt vermuten, dass die Synthese der Grundstrukturen evolutionär bereits sehr früh möglich war, die sich mit der Differenzierung der Pflanzen auch weiterentwickelt haben, so dass sich heute unterschiedliche Flavonoidmuster in verschiedenen Pflanzenfamilien zeigen. In Laubmoosen sind zunächst nur Flavone, Flavonole und Chalkone nachweisbar, während in Gymnospermen und einem Teil der Farne zusätzlich Proanthocyanidine vorliegen. Weiter entwickelte Pflanzen wie Angiospermen und ein Teil der Gymnospermen weisen auch monomere Anthocyanidine auf (Markham et al., 1977; Stafford, 1991; Koes et al., 1994).

Flavonoide übernehmen in Pflanzen vielfältige Funktionen, die letztlich einen Überlebensvorteil darstellen können. Diese Vielfalt der Funktionen hat sich gemeinsam mit den verschiedenen Flavonoidstrukturen evolutionär in Pflanzen entwickelt (Markham et al., 1977; Koes et al., 1994). Man geht davon aus, dass die ersten Flavonoide initial als physiologische Regulatoren und Signalmoleküle fungiert haben und noch fungieren. So können sie beispielsweise regulatorisch in den Transporter des Wachstumshormons Auxin hemmend eingreifen (Jacobs und Rubery, 1988; Brown et al., 2001).

Eine der frühesten Schutzfunktionen in den ersten Landpflanzen war vermutlich der Schutz des pflanzlichen Gewebes vor UV-Strahlung (Kubitzki, 1987; Stafford, 1991). Da für eine effiziente Photosynthese viele Pflanzen einen hellen Standort mit entsprechend hoher Sonneneinstrahlung bevorzugen, mussten diese entsprechende Schutzmechanismen vor DNA-Schäden durch die hohe UV-B-Belastung entwickeln. Dazu können u. a. verschiedene Flavonoide in die Vakuolen der Epidermiszellen eingelagert werden (Koes et al., 1994; Schmelzer et al., 1988). Ein kausaler Zusammenhang konnte durch Induktion der Flavonoidbiosynthese durch UV-Bestrahlung und durch Experimente mit Mutanten ohne Flavonoide in der Epidermis bestätigt werden. Im letzteren Experiment zeigten *Arabidopsis*-

Mutanten, die keine Flavonoide synthetisieren konnten, in den Epidermiszellen eine extreme UV-Empfindlichkeit (Schmelzer et al., 1988; Ormrod et al., 1995). Gleiches konnte auch mit Gerste gezeigt werden, in der die Photosyntheseleistung unter UV-Bestrahlung ohne Schutz durch Flavonoide erheblich abnahm (Liu et al., 1995; Reuber et al., 1996). Neben in der Vakuole gelösten Flavonoidglycosiden können Flavonoid-Aglyka, meist in methylierter Form, auch im Epicuticularwachs oder in Blatthaaren zum UV-Schutz eingelagert sein (Skaltsa et al., 1994; Cuadra und Harborne, 1996).

Zur Blütenfärbung werden neben Carotinoiden auch Flavonoide wie Anthocyane und Chalkone in den Vakuolen der Epidermiszellen eingelagert. Daneben haben augenscheinlich farblose Flavonoide wie beispielsweise Flavanole oder Flavone ebenso eine wichtige Funktion, da diese für Insekten im UV-Bereich als Muster erkennbar sind. Die Farbe der Blüten dient u. a. dem Anlocken von Tieren und Insekten, die die Blüte bestäuben. Sie können von magenta-rot bis tief blau variieren und durch Kopigmentierung mit farblosen Flavonen, Flavonolen und Komplexen mit Metallionen bzw. Anthocyan-Addukten weiter modifiziert werden (Kondo et al., 1992; Martin et al., 1993; Koes et al., 1994; Martens und Mithöfer, 2004). Während sich die an den Bestäuberorganismus angepasste Pigmentierung der Blütenblätter sehr vorteilhaft auf die Anzahl der bestäubten Blüten auswirkt (Waser und Price, 1983; Peer und Murphy, 2006; Shang et al., 2011), dienen die Färbungen der Stängel und der Früchte vermutlich hauptsächlich dem Anlocken von Früchte essenden Tieren, um die Samenverbreitung zu gewährleisten (Koes et al., 1994).

Flavonoide spielen nicht nur zur Anlockung durch optische Reize, um Bestäubung und Samenverteilung zu fördern, eine Rolle, sie dienen ebenso der Interaktion der Pflanze mit verschiedenen Mikroorganismen, Insekten oder Tieren. Diese können für den Interaktionspartner sowohl profitabel als auch schädlich sein. Zum Schutz vor Herbivoren kann eine induzierte Steigerung der Biosynthese von Flavonoiden mit Fraß-hemmender Wirkung beobachtet werden (Sutherland et al., 1980; Welle et al., 1991; Martens und Mithöfer, 2004) und helfen auch als Phytoalexine gegen den Befall mit pathogenen Pilzen, Bakterien oder Viren (Grayer und Harborne, 1994; Harborne 1999; Harborne und Williams, 2000). Aus diesem Grund akkumulieren beispielsweise Leguminosen Isoflavonoide zur Abwehr eindringender Pathogene. Dabei korreliert die Anreicherung der Isoflavonoide mit der Resistenz der Pflanze (Dixon, 1986; Harborne und Williams, 2000). Flavonoide können

auch direkt antifungal durch Hemmung der Sporenkeimung wirken (Grayer und Harborne, 1994; Stevenson und Haware, 1999).

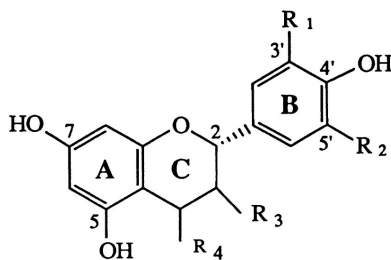
Die kontinuierliche Expression von Flavonoiden kann aber auch eine Bevorzugung und Fraß-fördernde Wirkung bei Herbivoren auslösen. Es ist zu beobachten, dass bei der Auswahl nicht die taxonomische Verwandtschaft der Wirtspflanzen bestimmend ist, sondern das Vorkommen bestimmter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (Feeny et al., 1988). Dabei spielen neben Flavonoiden, wie Flavonen, auch die Zusammensetzung des ätherischen Öls, Alkaloide und andere Inhaltsstoffe eine Rolle. Auf diese Weise können die Schmetterlinge *Danaus plexippus* und *Papilio polyxenes* Inhaltsstoffe visuell und flüchtige Bestandteile mittels Chemorezeptoren erkennen und gezielt mit der Eiablage beginnen (Feeny et al., 1988; Haribal und Renwick, 1996; Harborne und Williams, 2000).

Flavonoide können auch einen Einfluss auf die Fertilität der Gameten in Pflanzen haben. In Mais-Mutanten, in denen die Flavonoidbiosynthese geblockt wurde, zeigte sich, dass keine Selbstbestäubung möglich war, da der Pollenschlauch nur auf Pflanzen vom Wildtyp mit Flavonoiden ausgebildet werden konnte. Auch in flavonoidfreien Mutanten anderer Pflanzen konnte eine Sterilität des Pollens gezeigt werden (Coe et al., 1981; Mo, et al., 1992; Van der Meer et al., 1992)

Ebenso spielen Flavonoide bei der Nodulation und Bildung von Mykorrhiza-Geflechten eine wichtige Rolle. Die genaue Funktion der Flavonoide in der Mykorrhiza-Entwicklung ist noch unklar. Jedoch ist eine Kommunikation mit Signalmolekülen zwischen Pflanzen und Pilzen für die Symbiose nötig und demnach die Beteiligung von Flavonoiden im Allgemeinen vorstellbar (Martens und Mithöfer, 2005). Der Einfluss von Flavonoiden auf die Nodulation bei Leguminosen ist mehrfach belegt worden. Das von den Bakterien exprimierte NodD-Protein fungiert als Rezeptor, der von den freigesetzten Flavonoiden der Pflanzen aktiviert wird und damit die Nodulation stimuliert. Flavonoide können auch nodulationshemmend wirken. Die Wirkungsrichtung ist abhängig vom Bakterium, das das NodD-Protein exprimiert (Peters et al., 1986; Schlaman et al., 1992; Koes et al., 1994).

## 1.2. Flavonoidbiosynthese

Bis heute sind über 9000 Flavonoid-Strukturen bekannt (Williams und Grayer, 2004; Ferrer et al., 2008). Grundsätzlich handelt es sich um phenolische, niedermolekulare Substanzen, die aus zwei aromatischen Ringen A und B, verbunden über einen Heterozyklus C aus drei Kohlenstoffatomen und einem Sauerstoffatom, aufgebaut werden (Abbildung 1). Die hohe Diversität ist auf die vielen verschiedenen Möglichkeiten der Substituierung, Glycosylierung und Polymerisierung zurückzuführen. Zudem können Flavonoide je nach Oxidationsgrad des Heterozyklus bzw. der Position des aromatischen B-Rings in Untergruppen wie Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavanole, Isoflavonoide und Anthocyanidine unterteilt werden (Forkmann und Heller, 1999; Schijlen et al., 2004).



**Abbildung 1**

Flavonoid-Grundstruktur in 2S-Konfiguration.  
Die Stereoisomerie wird bei Desaturierung des C-Ringes aufgehoben.  
(Abbildung aus Stafford, 1991)

Die Vorstufen der Flavonoide stammen aus dem allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel und Malonyl-CoA, das mittels der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> synthetisiert wird. Zimtsäure entsteht aus Phenylalanin durch Aktivität der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL). Diese wird weiter durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL) zu 4-Cumaroyl-CoA umgesetzt (Forkmann und Heller, 1999). 4-Cumaroyl-CoA wird mit drei Molekülen Malonyl-CoA in einer Polyketidsynthese-Reaktion durch Chalkonsynthase (CHS) zum Naringeninchalkon kondensiert. Die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert anschließend eine stereospezifische Isomerisierung (Ringschluss) des Naringeninchalkons zum (2S)-Naringenin (NAR). Darauf basiert die 2S-Konfiguration aller natürlichen Flavonoide (Stafford, 1991; Forkmann und Heller, 1999). Die CHI ist ein Beispiel für die adaptive Evolution eines stereospezifisch und katalytisch effektiven Enzyms aus evtl. nicht enzymatischen Vorläufer-Polypeptiden, wie erst kürzlich nachgewiesen wurde (Ngaki et al, 2012). Dieses Flavanon NAR kann anschließend beispielsweise durch die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) weiter zum Eriodictyol (ERI) umgesetzt werden. Flavanone bilden

wichtige Zwischenstufen der verzweigten Flavonoidbiosynthese und können zu Verbindungen verschiedener Untergruppen umgesetzt werden (Abbildung 2).

Flavanone können mittels der Flavonsynthase (FNS) zu Flavonen wie Apigenin (Ap) und Luteolin (Lu) oxidiert werden. Diese Reaktion ist im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse, da sie in Abhängigkeit von der Pflanzenart durch unterschiedliche Enzyme katalysiert werden kann. Die FNS I ist eine 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase (2-ODD), die bisher nur in Pflanzen der Familie der Apiaceae nachgewiesen werden konnte (Britsch, 1990, Martens et al., 2001). Alle anderen Flavon-haltigen Pflanzenfamilien nutzen dafür die FNS II, eine NADPH-abhängige Cytochrom P450 Monooxygenase der Unterklasse CYP93B (Martens und Mithöfer, 2004).

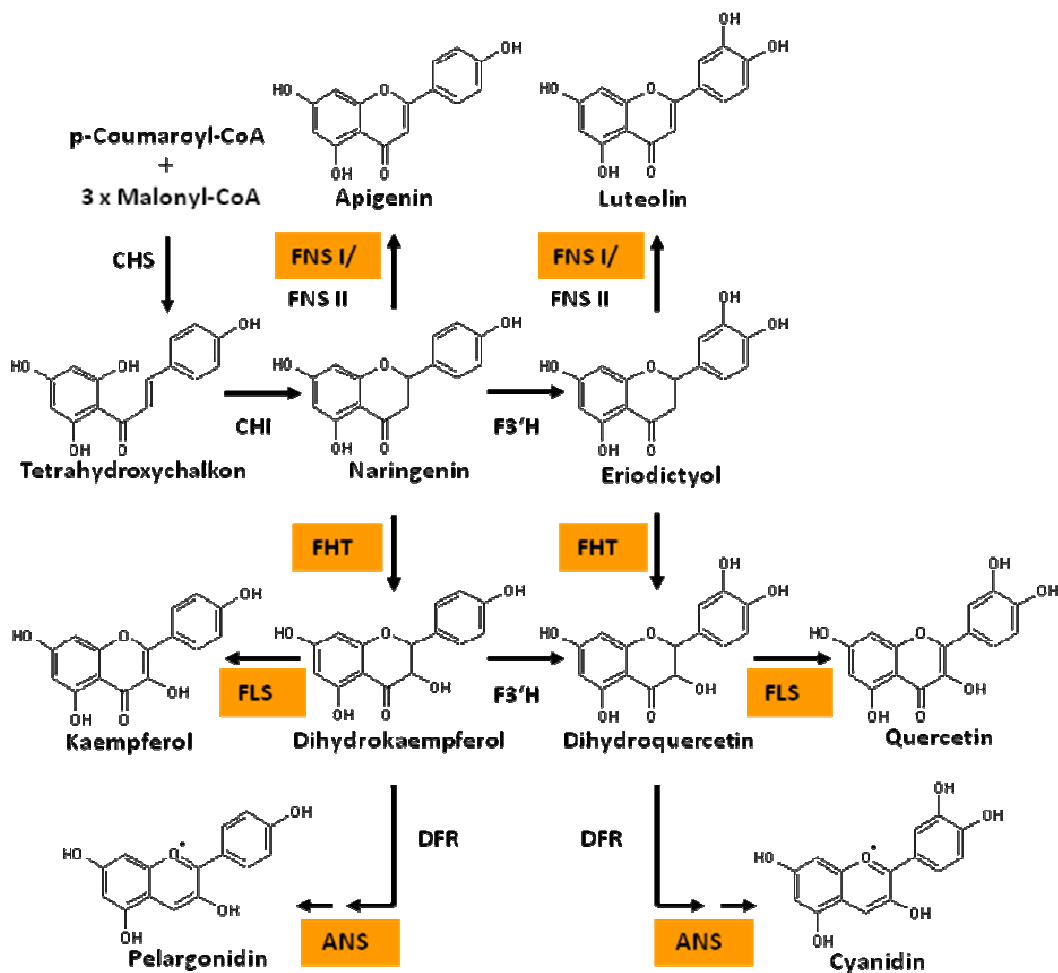


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Flavonoid-Biosynthese

Die für diese Arbeit relevanten Enzyme sind mit ihren Akronymen bekannt. Reaktionsschritte, die mittels 2-ODDn durchgeführt werden, sind orange markiert.

Alternativ können Flavanone mit Hilfe der Flavanon-3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT) auch zu Dihydroflavonolen wie Dihydrokämpferol (DHK) und Dihydroquercetin (DHQ) umgesetzt werden. Dihydroflavonole sind stabil und akkumulieren in einigen Pflanzen als Aglyka oder in Form verschiedener Glykoside. Häufig sind sie jedoch Zwischenprodukte zur Synthese von Anthocyanen, Proanthocyanidinen oder Flavonolen. Die Oxidation der Dihydroflavonole durch die Flavonolsynthase (FLS) liefert Flavonole, während die Reduktion des 4-Carbonyls durch die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) zu Leukoanthocyanidinen führt. Leukoanthocyanidine werden im folgenden Schritt durch die Anthocyanidinsynthase (ANS) zu Anthocyanidinen wie Pelargonidin (Pg) und Cyanidin (Cy) umgesetzt. Sowohl Leukoanthocyanidine als auch Anthocyanidine sind in Pflanzen kaum nachweisbar, da sie aufgrund ihrer Instabilität rasch enzymatisch oder chemisch umgesetzt werden. Verschiedene Glykosylierungen durch UDP-Glykosyltransferasen (UGT) stabilisieren die Anthocyanidine in Form der Anthocyane.

Zentrale Bedeutung in der Flavonoidbiosynthese besitzen die Oxygenasen, die entweder als Cytochrom P450 Monooxygenasen oder als 2-ODDn klassifiziert sind (Schijlen et al., 2004; Martens und Mithöfer, 2005). 2-ODDn spielen nicht nur in verschiedenen Stoffwechselwegen der Pflanzen eine große Rolle, sondern sind auch in unterschiedlichen Vorgängen des Primär- und Sekundärstoffwechsel aller anderen höheren Organismen und Mikroorganismen involviert (De Carolis und De Luca, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden vier dieser Oxygenasen - FNS I, FHT, FLS und ANS - genauer betrachtet.

### **1.3. Stressinduzierte Flavonoidbiosynthese in Pflanzen**

Wie bereits beschrieben reagieren Pflanzen auf verschiedene Umwelteinflüsse, Fraßfeinde oder den Befall mit Pathogenen mit der Bildung sekundärer Inhaltsstoffe, wobei dies nicht nur die Biosynthese der Flavonoide sondern auch andere Sekundärstoffwechselwege umfasst (Hartmann, 2007). So kann z. B. durch Zugabe von Methyljasmonat als Elicitor der Befall von Fraßfeinden und Pathogenen simuliert werden und dadurch die Synthese von Rosmarinsäure erhöht werden (Szabo et al., 1999; Ogata et al., 2004). Mit Elicitoren, wie Methyljasmonat, Salzen oder Herbiziden, können

beispielsweise auch Cumarin- oder Psoralensynthesen angeregt werden (Miksch und Boland, 1996; Ekiert und Gomolka, 2000; Staniszewka et al., 2003).

Die Flavonoidbiosynthese kann unter anderem durch ungünstige Umweltbedingungen wie beispielsweise Trockenheit, übermäßige Wässerung oder starke Sonneneinstrahlung beeinflusst werden, was in zahlreichen Studien einzelner Enzyme des Syntheseweges untersucht wurde (Harborne und Williams, 2000). Der bekannteste und am besten untersuchte Induktor der Flavonoidbiosynthese ist die UV-Strahlung. Bei erhöhter UV-Bestrahlung kann je nach Pflanze eine transient erhöhte Transkription und daraus resultierende Translation verschiedener Gene festgestellt werden (Harborne und Williams, 2000; Hirner et al., 2001; Ryan et al., 2001; Ryan et al., 2002; Schulze-Lefert et al., 1989), was zum Anstieg des Flavonoidgehalts führt und als Selektionsvorteil für die Pflanze interpretiert wird. Durch die vermehrte UV-Strahlung ist eine höhere Belastung aufgrund der erhöhten Anzahl freier Radikale zu erwarten. Diese schädlichen freien Ladungen können wiederum von den Flavonoiden in ihrer Funktion als Antioxidantien über die konjugierten Doppelbindungen der aromatischen Systeme der Ringe A und B (Abbildung 1) sehr gut delokalisiert werden (Huk et al., 1998; Aherne und O'Brien, 2000). Sie schützen somit die Pflanzenzellen vor DNA-Schäden und Peroxid-Bildung (Poss und Kasum, 2000).

Neben UV-Strahlung können auch starke Temperaturunterschiede die Synthese der Flavonoide beeinflussen. In Mais-Keimlingen und Blättern der Gerste konnte ein Expressionsanstieg der DFR durch niedrige Temperaturen festgestellt werden (Christie et al., 1994; Matínez und Favret, 1990). Unter gleichen Bedingungen konnte ebenfalls in Mais und Gingko eine vermehrte Expression der ANS beobachtet werden (Christie et al., 1994; Xu et al., 2008). Der hier zu erwartende Vorteil für die Pflanze ist bisher nur schwer zu erkennen.

Eine Steigerung der ANS-Menge kann in verschiedenen Pflanzen auch durch Zugabe von Signalmolekülen erreicht werden (Xu et al., 2008). Signalmoleküle dienen der Pflanze Mangelzustände oder negative Umwelteinflüsse zu erkennen und zu kompensieren. Beispielsweise lässt sich nach der Gabe des Phytohormons Gibberellinsäure ein Anstieg der Flavonoidkonzentration nachweisen. Gerste, die mit Gibberellinsäure gewässert wurde, zeigte vermehrte DFR-Aktivität (Matínez und Favret, 1990). Als weitere Signalmoleküle werden Abscisinsäure, Ethylen oder Salicylsäure eingesetzt, die in der Pflanzenzelle Wassermangel simulieren und in verschiedenen Pflanzen ebenfalls zu vermehrter Flavonoidbildung führen (Xu et al., 2008). Eine andere Möglichkeit Wassermangel zu



simulieren, bieten stark osmotisch wirksame Substanzen. Durch Ausnutzen dieses Verhaltens konnte gezeigt werden, dass in *Ginkgo* und *Vitis*-Zellkulturen die ANS-Expression durch Zugabe von Saccharose und Natriumchlorid anstieg (Xu et al., 2008; Yamakawa et al., 1983). Eine weitere Aktivierung der ANS-Biosynthese konnte durch Mangel an Phosphat oder Nitrat erreicht werden (Yamakawa et al., 1983).

Es ist zu vermuten, dass unter solch suboptimalen Wachstumsbedingungen die Gefahr einer vermehrten Bildung freier Radikale besteht. Flavonoide können die Pflanze vor diesem oxidativen Stress schützen und eventuell als Signalmolekül verschiedene andere Schutzmechanismen, z.B. zur Regulierung des Auxin-Transportes, in Gang setzen. Zudem können Anthocyane als Zuckerspeicher genutzt werden, der bei hoher Photosyntheseleistung oder hohem osmotischem Druck durch Zucker angelegt und unter gewechselten Bedingungen wieder freigesetzt wird (Hernández und Van Breusegem, 2010; Ubi, 2004).

#### **1.4. Pharmazeutische Bedeutung von Flavonoiden**

Flavonoiden wurden verschiedene biologische Wirkungen zugeschrieben, wobei die Mechanismen der beobachteten Effekten noch weitestgehend unklar sind. Eine der bedeutendsten Eigenschaften, die den Flavonoiden nicht nur pharmazeutische Bedeutung verschafft, sondern auch für die Pflanzen selbst wichtig ist, ist der Schutz der DNA und der Zelle durch ihre antioxidative Kapazität. Die chemische Struktur der Flavonoide ermöglicht die Fixierung und Stabilisierung von leicht oxidierbaren Metallionen in einem Chelatkomplex und die Bindung freier Radikale durch Delokalisation (Ferrali et al., 2001; Elund, 2004). Ferner ist ihre Wirkung als Signalmolekül in der Proteinbiosynthese bereits in Pflanzen beschrieben worden, wodurch die Expression detoxifizierender Enzyme verstärkt werden kann (Nagao et al., 1999; Myhrstad et al., 2002).

Flavonoiden wird eine protektive Wirkung auf das Herzkreislaufsystem zugeschrieben, da in verschiedenen Studien das Schlaganfallrisiko und das Risiko koronarer Herzkrankheiten vermindert war (Hertog et al., 1993; Hertog et al., 1997; Ness und Powles, 1997; Leopoldini et al., 2010; Schröter et al., 2010). Weiter zeigte die regelmäßige Fütterung von Kaninchen mit Citrus-Säften eine Besserung einer induzierten Hypercholesterinämie, indem erhöhte

Blutfettwerte an LDL (Low Density Lipoprotein), die Arteriosklerose und die daraus resultierenden Herzkreislauferkrankungen negativ beeinflussen, gesenkt wurden. Gleichzeitig stieg in diesen Versuchen der gefäß- und kardioprotektive HDL-Anteil (High Density Lipoprotein) (Kurowska et al., 2000a+b).

Eine postulierte antikanzerogene bzw. antiproliferative Wirkung von Flavonoiden könnte auf ihre antioxidative Wirkung zurückgeführt werden. Flavonoide könnten ebenso die Proteinexpression oder die Wirkung proliferationsfördernder Rezeptoren modulieren, wie bereits in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden konnte (Hansen et al., 1997; Kuntz et al., 1999; Ranelletti et al., 2000; Xing et al., 2001; Kandeaswami et al., 2005, Amado et al., 2011).

Eine weitere therapeutische Bedeutung haben Flavonoide durch ihre deutliche antibakterielle und antivirale Aktivität, die auf der Hemmung wichtiger Replikationsenzyme beruht. Zu den gehemmten Enzymen gehören beispielsweise die bakterielle Gyrase und die retrovirale Transkriptase (Middelton et al., 2000; Plaper et al, 2003). Darüber hinaus besitzen Flavonoide entzündungshemmende Wirkung, die durch verminderte Expression von Induktoren wie  $\text{TNF}\alpha$ , das an Entzündungen beteiligte Zelladhäsionsmolekül, erklärt werden kann (Kobuchi et al., 1999; Kim et al, 2006). Flavonoide haben einen modulierenden Effekt auf verschiedene Zellen des Immunsystems (Middleton et al., 2000).

Allerdings basieren die meisten Ergebnisse zur Wirksamkeit von Flavonoiden auf *in vitro*-Studien, die in epidemiologischen Studien nicht immer verifiziert werden konnten bzw. wegen kleiner Studiengruppen oder kurzer Beobachtungszeiträume nicht überzeugen (Schröter et al., 2010). Voraussetzung für zuverlässige Aussagen wäre die Bestimmung von Plasmaspiegeln der Flavonoide und ihrer Metaboliten sowie spezifischere *in vitro*-Studien mit Intermediaten, um mögliche Wirkungsverluste durch Derivatisierung im menschlichen Organismus zu erkennen (Ross und Kasum, 2002; Erlund, 2004). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass ein regelmäßiger Verzehr von flavonoidhaltigen Lebensmitteln wahrscheinlich das Risiko reduziert, an Krebs (Lunge, Colon), koronaren Herzkrankheiten, chronischen Entzündungen und Osteoporose zu erkranken (Martens und Mithöfer, 2004).

Eingesetzt werden z. B. bereits Salben bzw. Gele mit Flavonoid-Derivaten aus dem roten Weinlaub zur Linderung bei Beinvenenleiden (Wolf, 2007). Auch werden Quercetin (Qu) enthaltende Präparate zur Verbesserung der Immunabwehr angewendet. Flavonoide sind Bestandteil von Gingko Blättern und sollen nach Kommission E zur

durchblutungsfördernden, antidementiellen Wirkung beitragen. Auszüge aus Johanniskraut, insbesondere ölige Auszüge, enthalten ebenfalls v.a. lipophile Flavonoide wie Qu und I3,II8-Biapigenin und können innerlich bei dyspeptischen Beschwerden und äußerlich bei stumpfen Verletzungen eingesetzt werden. Alkoholisch-wässrige Extrakte werden aufgrund des Gehaltes an Hypericin und Hyperforin, aber auch der Flavonoide bei leichten depressiven Verstimmungen und Schlafstörungen angewendet. Der Flavonoid-Fingerprint wurde bei der Analyse des Johanniskraut-Pflanzenmaterials als Qualitätsmerkmal herangezogen (Loew et al., 1999), das neuerdings durch Parameter wie Droge:Extrakt-Verhältnis und Hyperforin-Gehalt abgelöst wurde.

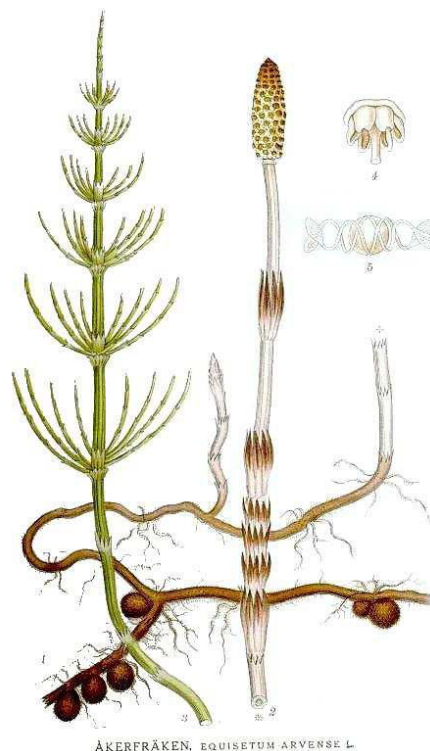
Volksmedizinisch werden Flavonoid-Drogen wie *Equisetum arvense* als Diuretikum eingesetzt. Parallel zu den analytischen Untersuchungen wurden mit Extrakten aus *E. arvense* verschiedene *in vitro* und auch einige *in vivo* Studien zur Wirksamkeit durchgeführt und diese Wirkung bestätigt (Perez Gutiérrez et al., 1985; Lemus et al., 1996).

## **2. *Equisetum arvense* und *Petroselinum crispum***

### **2.1. *E. arvense***

*E. arvense*, der Ackerschachtelhalm oder auch Zinnkraut (Abbildung 3), gehört zur Familie der Schachtelhalmgewächse (Equisetaceae) und damit zu den evolutionär ältesten Landpflanzen. Die Pflanze ist mehrjährig, allgemein krautig und auf der gesamten Nordhalbkugel von der arktischen bis zur submediterranen Klimazone verbreitet. Sie bevorzugt helle und feuchte Standorte auf sandigen oder lehmhaltigen Böden.

Die Schachtelhalmgewächse sind der Unterabteilung der farnähnlichen Pflanzen und den Gefäßsporenpflanzen zugeordnet. Die Fortpflanzung erfolgt über einen heteromorphen und heterophasischen Generationswechsel, wobei der Sporophyt zu unterschiedlichen Vegetationszeiten einen fertilen und einen sterilen Spross bildet, die sich gut voneinander unterscheiden lassen. Der etwa 20 cm hohe fertile Winterspross besteht aus einem fleischigen Stängel mit die Nodien umgebenden, gezähnten Scheiden. Der Sprossabschluss besteht aus einem ährenförmigen Sporangium (Abbildung 3, rechts). Von den Stängelnodien des filigranen, bis zu 50 cm hohen, sterilen Blattsprosses gehen Seitenabzweige in Wirteln ab. An den Nodien entspringen ebenfalls einnervige, zahnige Blätter, die zu einem Quirl verwachsen sind (Abbildung 3, links). Der Vegetationszeitraum des fertilen Sprosses erstreckt sich von März bis Anfang Mai. Erst nach Ausstäuben und Absterben des sporangientragenden Triebes erscheint der sterile Spross. Neben der Verbreitung des Ackerschachtelhalmes mittels Sporen kann sich die Pflanze auch vegetativ über ihr bis zu 2 m tiefes und weitverbreitetes Rhizom vermehren. Der Gametophyt entwickelt sich aus den freigesetzten Sporen des fertilen Sprosses durch Keimung auf geeignetem, feuchtem Boden. Nach Befruchtung des weiblichen mit einem männlichen Gameten entwickelt sich aus dem



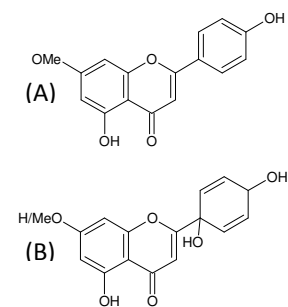
**Abbildung 3**

*E. arvense* (Ackerschachtelhalm)

aus Bilder des Nordens Flora (1901-1905) von Carl Axel Magnus Lindman.

Embryo ein steriler Spross, aus dessen Rhizom wiederum ein fertiler Spross hervorgehen kann.

Die Inhaltsstoffe des Ackerschachtelhalmes sind gut untersucht. Neben dem Vorkommen von Poly- und Dicarbonsäuren, Sitosterin und Vitamin C sowie einem auffällig hohen Gehalt an Kieselsäure liegen in *Equisetum* verschiedene Styrylpyron- und Flavonoidglykoside vor (Beckert et al., 1997; Wagner, 1999). Die Verteilung von Styrylpyronen und Flavonoiden in den unterschiedlichen Generationen und Organen wurde intensiv untersucht. Während Flavonoide nur in den oberirdischen Pflanzenteilen des Sporophyten gefunden werden konnten, werden weniger häufige Styrylpyrone überwiegend im Rhizom des Sporophyten und in Gametophyten detektiert. Das Muster ist kompatibel mit der Verteilung der spezifischen Biosynthese-Enzyme (Beckert et al., 1997). Neben den Flavonen Ap und Lu überwiegen die Flavonole Km und Qu, wobei auch seltenere, methylierte Flavonoide wie Genkwanin und Protoflavone wie Protoapigenin und Protogenkwanin (Abbildung 4), deren Synthesewege bis heute noch nicht aufgeklärt sind, nachgewiesen wurden (Saleh et al., 1972; Veit et al., 1995).



**Abbildung 4**

(A) Genkwanin  
(B) H: Protoapigenin  
MeO: Protogenkwanin

Die Inhaltsstoffe verschiedener *Equisetum* Arten wurden schon früh untersucht, extrahiert und verglichen. Dabei wurden die selten vorkommende Protoflavone in den Sporophyten-Sprossen und Styrylpyrone im Rhizom sowie in Gametophyten in den verschiedenen Arten nachgewiesen.

Obwohl der Weg der Flavonoid-Biosynthese bekannt ist und die meisten Enzyme aus anderen Pflanzen beschrieben sind, fehlen entsprechende Studien aus *E. arvense*, mit Ausnahme von CHS und PAL, deren Polypeptid-Sequenzen in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind (Accession-No.: *Ea*PAL: AAW80639 *Ea*CHS: BAA89501). Spezifische Enzyme der Genkwanin- bzw. Protoflavon-Synthese wurden bisher jedoch noch nie beschrieben. Aus diesem Grund wurden die Enzymaktivitäten in der vorgelegten Arbeit zunächst im Pflanzenrohextrakt von *E. arvense* untersucht, um im Anschluss die genetische Information der verantwortlichen Enzyme zu klonieren sowie die exprimierten Enzyme zu charakterisieren und die gewonnenen Ergebnisse mit den bisherigen Annahmen zu

vergleichen. Aufgrund des evolutionären Alters der Pflanze wurden so phylogenetisch interessante Erkenntnisse erwartet.

## 2.2. *P. crispum*

*P. crispum* (Petersilie) gehört zur Familie der Doldengewächse (Apiaceae). Die zweijährige, krautige Pflanze, die ursprünglich im Mittelmeerraum beheimatet ist, kann 30 bis 90 cm hoch wachsen. Durch Kultivierung ist sie heute als Gewürz in ganz Europa, Russland, Indien und Nordamerika verbreitet. Ihrer Heimat entsprechend bevorzugt die Pflanze eher sandigen Boden und einen hellen Standort.

Im ersten Jahr der Vegetationszeit bildet die Pflanze eine rübenartige Wurzel aus, von der aus eine Blattrosette entspringt. An diesen befinden sich dunkelgrüne, doppelt bis dreizählig gefiederte Blätter. Im zweiten Jahr bilden sich einige längere Stängel, die Blütenstände, langgestielte Doppeldolden mit grünlich gelben Blüten, ohne Hülle und Hüllchen, ausbilden. Als Früchte werden etwa 2-3 mm große, dunkelbraune Spaltfrüchte gebildet, deren Rippen



Abbildung 5

*P. crispum* (Krause Petersilie)

aus Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885) von Otto Wilhelm Thomé.

durch eine hellgelbe Farbe deutlich hervortreten. Alle Pflanzenteile verbreiten einen typisch aromatischen Geruch, da sie alle von Ölgängen mit ätherischem Öl durchzogen sind.

Petersilie enthält als wirksamkeitsbestimmenden Hauptbestandteil ätherisches Öl mit den Phenylpropanderivaten Apiol, Myristizin und 1-Allyl-2,3,4,5-tetra-methoxybenzol, wodurch ihre Wurzel die Hauptwirkung einer vermehrten Diurese (siehe I.3.2.) erlangt (Schilcher et al., 2007). Zudem sind in der Pflanze die Furanocumarine Bergapten und Oxypeucedanin enthalten, die bei empfindlichen Personen oder übermäßigem Verzehr eine Photosensibilisierung hervorrufen können. Zusätzlich enthält Petersilie Flavonoide, die von verschiedenen Autoren als die Flavonole Qu und Km sowie als die Flavone Ap und Lu identifiziert wurden (Gebhardt et al., 2005; Harborne und Williams, 1971).

Aufgrund der Möglichkeit Petersilie in Zellkultur zu kultivieren, wurde diese Art für verschiedenste Fragestellungen genutzt. Auf diese Weise wurde u. a. die Induzierbarkeit der Flavonoidbiosynthese durch Licht/UV-Bestrahlung intensiv untersucht. Für die aus *P. crispum* bekannten Flavonoide wurden alle Biosyntheseenzyme heterolog exprimiert und charakterisiert. Die Kenntnis der beteiligten Enzyme und deren Induktion unter Licht- bzw. UV-Bestrahlung konnte direkt mit dem Flavonoidgehalt korreliert werden (Hahlbrock et al., 1971; Hahlbrock und Schröder, 1975; Wellmann, 1983). Insbesondere ist die Identifizierung der FNS I in Abweichung zur FNS II zu erwähnen, die in allen anderen Pflanzenfamilien die Oxidation von Flavanonen zu Flavonen katalysiert (siehe I.1.1.) (Britsch, 1990; Martens et al., 2001). Dies ist umso bemerkenswerter, nutzen doch FNS I und FNS II völlig verschiedene Enzymklassen für die gleiche Reaktion. Das sehr begrenzte Vorkommen der FNS I war ein Anlass für die hier vorgestellten Untersuchungen in *E. arvense*.

Weiter wurde eine Rotfärbung der Petersilie unter Stressbedingungen beobachtet, die bisher jedoch nicht Gegenstand von veröffentlichten Untersuchungen gewesen ist und in der hier veröffentlichten Arbeit durch Identifizierung der auslösenden Stressbedingungen und des roten Farbstoffes sowie durch Klonierung und Expression der verantwortlichen Enzyme untersucht wurde.

### **3.     Therapeutischer Nutzen von *E. arvense* und *P. crispum***

#### **3.1.   Therapeutischer Nutzen von *E. arvense***

Traditionell wurde der Ackerschachtelhalm bei unterschiedlichen Indikationen eingesetzt. Ein Tee aus den sterilen Sprossen wurde bei allgemeinen Erkrankungen der Niere und ableitenden Harnwege, sowie der unteren Atemwege und des Magen-Darm-Traktes und ferner zur Versorgung von Geschwüren und Wunden aller Art eingesetzt. Aber auch bei anderen Erkrankungen wie Leberstauung, Haarausfall, Milzschwellung, Arteriosklerose, Mandelschwellung, Blutarmut, Mundfäule, Zahnentzündungen und Nasenbluten fand die Droge Anwendung (Wagner und Bauer, 1999, Schilcher, 2007).

Heute ist der Einsatz des Ackerschachtelhalmkrauts auf homöopathische Behandlung der ableitenden Harnwege eingeschränkt. Das Kraut wird auch allopathisch behandlungsunterstützend verwendet und ist im deutschen, österreichischen und schweizerischen Arzneibuch als Arzneidroge aufgeführt. Eine leicht diuretische, antioxidative und hepatoprotektive Wirkung konnte *in vitro* gezeigt werden (Lemus et al., 1996; Oh et al., 2004; Nagai et al., 2005). Nach Kommission E sind Teeauszüge der Droge *Equiseti herba* innerlich als Aquaretikum bei posttraumatischen und statischen Ödem, bei bakteriellen, entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege sowie bei Nierengrieß einzusetzen. Dabei rufen die Flavonoid-Inhaltsstoffe die Wirkung hervor. Zudem kann es äußerlich adjuvant bei schlecht heilenden Wunden angewandt werden (Wagner und Bauer, 1999; Graefe und Veit, 1999; Bäumler, 2006).

#### **3.2.   Therapeutischer Nutzen von *P. crispum***

In der Volksmedizin wird Petersilie in unterschiedlichsten Zubereitungen gegen Milz- und Leberleiden, Menstruationsbeschwerden und als Karminativum, Stomachikum, Diuretikum sowie Aphrodisiakum eingesetzt. In der Homöopathie bleibt der Einsatz auf Erkrankungen der Nieren und der ableitenden Harnwege, wie Reizblase, und Leberleiden beschränkt (Wagner und Bauer, 1999, Schlicher, 2007).



Ein diuretischer Effekt konnte auf Rattennieren *in vivo* bzw. *in vitro* nachgewiesen werden (Kreydiyyeh und Usta, 2002). In die Bewertung der Kommission E der Droge Petroselin herba bzw. Petroselin radix wurden als Indikation die Durchspülungstherapie bei Erkrankungen der ableitenden Harnwege und Nierengrieß aufgenommen. Die Arzneidroge darf jedoch nicht bei Entzündungen der Niere angewendet werden, da ein Teil der diuretischen Wirkung auf die Reizung des Nierenparenchyms durch das ätherische Öl zurückzuführen ist. Das ätherische Öl zeigt *in vitro* zusätzlich eine Uteruskontraktionsfördernde Wirkung (Opdyke, 1975). Aus diesem Grund kann es als schwaches Emmenagogum bei Amenorrhoe oder Dysmenorrhoe eingesetzt werden. In der Schwangerschaft ist es wegen einer möglichen abortiven Wirkung kontraindiziert (Bäumler, 2006; Wagner und Bauer, 1999).

Bei der Verwendung von frischem Petersilienkraut in der Küche wird in der Regel keine therapeutische Dosis erreicht. Jedoch ist eine reflektorische appetitsteigernde Wirkung aufgrund des aromatischen Geschmacks von Gewürzen mit ätherischem Öl nicht zu unterschätzen.

## **4. 2-ODDn in Pflanzen**

### **4.1. Bedeutung von 2-ODDn**

Die Enzymklasse der Dioxygenasen nutzt molekularen Sauerstoff für Oxidationsreaktionen und katalysiert Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Desaturierungen oder Ringschlüsse (Prescott und John, 1996; Prescott und Lloyd, 2000; Welford et al., 2005; Wellmann et al., 2004). Neben der Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Hauptsubstrat wird die Reaktion von einer oxidativen Decarboxylierung des 2-Oxoglutarats begleitet (Prescott und Lloyd, 2000).

Die Enzymklasse der Dioxygenasen ist in der Natur weit verbreitet und am Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pflanzen, aber auch in Mikroorganismen und tierischen Organismen, beteiligt (De Carolis und De Luca, 1994). Besondere Beachtung hat z. B. die Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) gefunden, die Prolinreste in Kollagen hydroxyliert und deren Fehlen zu ernsten Stoffwechselstörungen im humanen Metabolismus führt (Fong and

Takeda, 2008). P4H ist auch für die Modifizierung von Zellwandproteinen höherer Pflanzen von Bedeutung (Prescott und John, 1996).

Weiter sind 2-ODDn im Aminosäure-Stoffwechsel von hoher Bedeutung. In Pflanzen ist die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (4-HPPD) essentiell an der Bildung einer  $\alpha$ -Tocopherol- und Plastochinon-Vorstufe aus Tyrosin beteiligt. Ein Defekt von 4-HPPD führt somit zur Anreicherung von Tyrosin und einem Mangel an Vitamin E. In Mais wurde die Überexpression genutzt, um erhöhte Vitamin E-Spiegel zu erreichen (Pallett et al., 1998; Prescott und Lloyd, 2000). Das 2-Oxosäure-Derivat von Leucin,  $\alpha$ -Ketoisocaproat ( $\alpha$ -KIC), kann durch Hydroxylierung und anschließender Decarboxylierung mittels der  $\alpha$ -KIC-Dioxygenase ( $\alpha$ -KICD) und 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (4-HPPD) in  $\beta$ -Hydroxyisovalerat überführt werden. In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich beide Enzyme sehr ähnlich sind und Reaktionen sogar übernommen werden können (Baldwin et al., 1995). Auch können andere aliphatische und aromatische 2-Oxosäuren umgesetzt werden (Crouch et al., 1996; Crouch et al., 1997).

Ein weiteres Beispiel ist die Ethylensynthese. Ethylen ist ein sehr wichtiges Signalmolekül von Pflanzen im Reifungsprozess der Früchte, der Alterung (Welken) von Geweben und bei der Antwort auf Gewebeverletzungen und pathogenem Befall. Es wird in 2 Schritten aus S-Adenosin-L-Methionin (SAM) gebildet. Im ersten Schritt wird durch 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase (ACCS) aus SAM 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat (ACC) gebildet, das im zweiten Schritt mit Hilfe der 2-ODD ACC-Oxidase (ACCO = ethylene forming enzyme EFE) durch oxidative Fragmentierung in Ethylen, Blausäure, Wasser und Kohlendioxid überführt wird (Zhang et al., 1995; Iturriagagoitia-Bueno et al., 1996; Prescott and Lloyd, 2000). Bemerkenswert ist, dass die ACCO kein 2-Oxoglutarat als Kofaktor, aber Ascorbat und  $\text{CO}_2$  benötigt. Bicarbonat schützt und aktiviert das Enzym; der zugrunde liegende Mechanismus ist aber unbekannt. Nur eine weitere 2-Oxoglutarat-unabhängige Eisen(II)-Dioxygenase, Isopenicillin N-Synthase (IPNS), ist bekannt, die offensichtlich kein Kosubstrat benötigt (Smith und John, 1993; Zhang et al., 2004).

Gibberelline (GAs) sind endogene Wachstumsregulatoren von Pflanzen, die die Verankerung im Boden, die Blütenbildung in Langtags- und zweijährigen Pflanzen fördern und vermutlich als Stimulanzien das generelle Wachstum sowie die Ausbildung der Organe beeinflussen (Mutasa-Göttgens und Hedden, 2009). Die Biosynthese der Gibberelline in den Plastiden wird bis zum GA-Grundgerüsts vor allem von Monooxygenasen katalysiert,

während die nachfolgenden Modifikationen durch 2-ODDn im Zytoplasma erfolgen. Eine Besonderheit der GA-Biosynthese, wie z. B. in *Cucurbita maxima*, ist, dass beim Übergang von den Plastiden zum Zytosol für die gleiche Reaktion sowohl Monooxygenasen als auch Dioxygenasen genutzt werden können (Lange et al., 1993; Lange et al., 1994). Bisher sind sechs relevante Dioxygenasen - GA 7-Oxidase, GA 13-Hydroxylase, GA 12 $\alpha$ -Hydroxylase, GA 20-Oxidase, GA 3 $\beta$ -Hydroxylase und GA 2-Oxidase - identifiziert worden, deren Bezeichnung sich jeweils nach demjenigen C-Atom des Grundgerüsts richtet, das oxidiert wird (Hedden und Phillips, 2000).

Dioxygenasen sind auch an der Synthese von Tropan- und Indolalkaloiden beteiligt. Das Tropanalkaloid Scopolamin wird in zwei Schritten aus Hyoscyamin durch das Enzym Hyoscyamin-6 $\beta$ -Hydroxylase (H6H) gebildet. Zunächst wird das C6 hydroxyliert und dann mit dem C7 ein Epoxid gebildet. Die bei diversen Karzinomen und Lymphomen als Zytostatikum eingesetzten Indolalkaloide Vinblastin und Vincristin entstehen aus Desacetoxyvindolin, das durch Desacetoxyvindolin-4-Hydroxylase (D4H) hydroxyliert wird (Prescott und Lloyd, 2000).

Enzyme der 2-ODD-Klasse sind ebenfalls an der Synthese und Modifizierung verschiedener Flavonoide beteiligt (Abbildung 2), welche in der vorgelegten Arbeit untersucht wurden. Es handelt sich um fünf Dioxygenasen, die die klassischen Kofaktoren Eisen(II)ionen und 2-Oxoglutarat benötigen und aus verschiedenen Pflanzen identifiziert wurden. Neben FHT, FNS I, FLS und ANS gehört dazu eine Flavonol 6-Hydroxylase, von der allerdings bisher nur aus *Chrysosplenium americanum* berichtet wurde (Anzellotti und Ibrahim, 2000). Das beschriebene Enzym hydroxyliert den A-Ring methylierter Flavonole. Die Katalyse der Hydroxylierung phenolischer Ringe von Flavonoiden wurde sonst bisher nur von P450-Monooxygenasen beschrieben (Forkmann, 1991; Forkmann und Heller, 1999).

#### 4.2. Sequenzhomologie und Evolution der 2-ODDn

Die Verbreitung der jeweiligen Oxygenasen im Pflanzenreich ist noch nicht abschließend erforscht. Trotz unterschiedlicher Funktionen zeigen 2-ODDn hohe Ähnlichkeit in ihren DNA- und Polypeptid-Sequenzen im Bereich des aktiven Zentrums. Charakteristische konservierte Domänen treten zum größeren Teil in der carboxyterminalen Hälfte auf. Entsprechend gilt für 2-ODDn unterschiedlicher Stoffwechselwege eine allgemeine Identität von mindestens

30 % auf Polypeptid-Ebene (Prescott und John, 1996). Je nach evolutionären Zusammenhängen treten höhere Identitäten bis zu 80 % auf, wie beispielsweise zwischen FNS I und FHT (Gebhardt et al., 2005).

Sequenzvergleiche verschiedener 2-ODDn identifizieren fünf größere konservierte Bereiche (Britsch et al., 1993), von denen einige einer Funktion in der katalytischen Aktivität zugeordnet werden konnten. Dazu gehört beispielsweise das HxD-Motiv innerhalb des vierten konservierten Abschnittes. Diese streng konservierten Aminosäuren bilden im nativ-gefalteten Protein gemeinsam mit einem etwa 50 bis 60 Aminosäuren entfernt liegenden Histidin, dem HxD(53-57)xH-Motiv (Borovok et al., 1996; De Carolis und De Luca, 1994), und dem fixierten 2-Oxoglutarat die Koordinationsstelle für das benötigte Eisen(II)ion (Hegg und Que, 1997; Lukačín und Britsch, 1997; Britsch et al., 1993; Doan et al., 2000). Die absolute Notwendigkeit dieses Motivs für die Aktivität konnte in Mutationsstudien (Lukačín und Britsch, 1997, Doan et al., 2000) und ihre Funktion zur Komplexierung des Eisen(II)ions durch Kristallisationsversuche nachgewiesen werden (Ryle und Hausinger, 2002; Wilmouth et al., 2002).

Im konservierten fünften Abschnitt befindet sich, neben dem zweiten Histidin zur Koordinierung des Eisen(II)ions, ein RxS-Motiv, das als Bindestelle des Kofaktors 2-Oxoglutarat im aktiven Zentrum dient (Clifton et al., 2001; Britsch et al., 1993). Einerseits stabilisiert dieser Kofaktor das komplexierte Eisen(II)ion (Doan et al., 2000; Wilmouth et al., 2002) und ist andererseits Akzeptor des nicht auf das Substrat übertragenen Sauerstoffatoms bzw. Elektronendonator für die Reaktion (De Carolis und De Luca, 1994; Schofield und Zhang, 1999). Andere konservierte Sequenzmotive (Abbildung 40, 60 und 61) sind vermutlich für die Konformation des aktiven Enzyms erforderlich (Wellmann et al., 2002; Martens et al., 2003; Wellmann et al., 2004).

Die konservierten Motive der 2-ODD-Polypeptide bzw. Genstrukturen lassen auf einen gemeinsamen Ursprung, auf multifunktionelle Ursprungsenzyme, schließen. Auf diese Weise lassen sich die häufig vorhandenen Multifunktionalitäten der 2-ODDn der Flavonoid-Biosynthese erklären (Prescott et al., 2002; Turnbull et al., 2004). Durch Genverdopplung und Mutationen können sich aus multifunktionellen Proteinen aber auch hochspezifische Enzyme entwickeln, die mit einer viel höheren Selektivität die jeweilige Reaktion umsetzen (Lynch und Force, 1999; Hughes, 2002; Ober und Kaltenecker, 2009).

Gemeinsamkeiten zeigen auch die Genstrukturen der 2-ODDn mit vier konservierten Intronpositionen. Die möglichen Introns wurden entsprechend ihrer relativen Positionen im Gen von 1 bis 4 nummeriert (Abbildung 6), was die Zuordnung der relativen Intronposition in 2-ODD-Genen mit weniger als vier Introns ermöglicht. Die Introns der gleichen Position weisen in unterschiedlichen Organismen immer die gleiche Phase auf (Prescott und John, 1996; Gebhardt et al., 2005), die sich aus dem nicht durch drei teilbaren Rest der Anzahl der codierenden Nucleotide vor dem Intron ergibt. Die Übereinstimmung der Intronstrukturen in 2-ODDn spricht für die Genduplikation der genetischen Information mit anschließender Spezialisierung und späterem evtl. Verlust des Introns im Gen. Durch häufige Mutationen geht meist die Funktion des exprimierten Proteins verloren, sie kann aber auch zu veränderten Aktivitäten führen. Auf diese Weise können somit Evolutionsvorteile für den jeweiligen Organismus erhalten werden (Hughes, 1994; Lynch und Force, 1999; Ober, 2005).

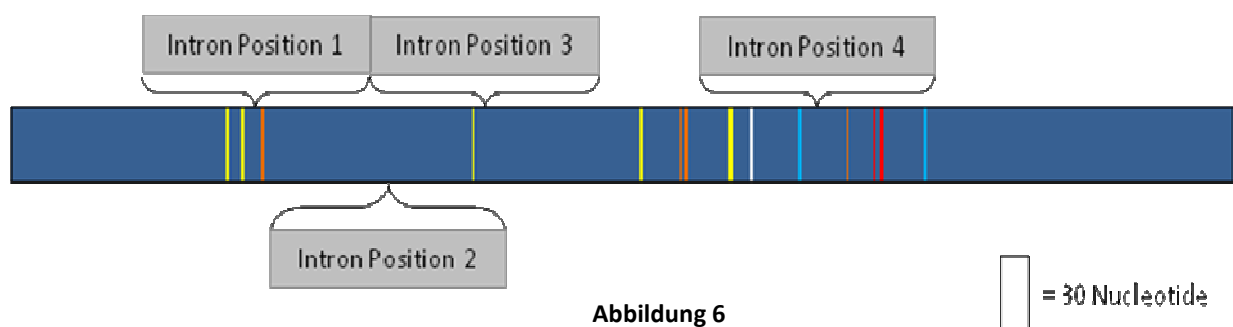


Abbildung 6

Schematische Darstellung der Intron-Positionen in Dioxygenasen.

Als Beispiel für die Lage der konservierten Bereiche und relativen Intronpositionen wurde die ANS aus *P. crispum* dargestellt (nach Prescott und John, 1996)

Die farbig markierten Balken im dunkelblauen Hintergrund entsprechen Codons konservierter Aminosäuren:  
 Gelb = Aminosäuren, die für die Faltung wichtig sind; Orange = Aminosäuren (HxD-Motiv + H) zur Komplexierung des Eisen-II-Ions im aktiven Zentrum; Rot = RxS-Motiv zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats in der Bindetasche; Hellblau = Aminosäuren, deren Funktion noch nicht bekannt ist; Weiß = Deletionen

#### 4.3. Reaktionsmechanismus von 2-ODDn

Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen sind mikrosomal gebundene Enzyme, die nur ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen (Martens und Forkmann, 1998), während das andere Atom des Sauerstoffmoleküls zu Wasser reduziert wird. Dagegen sind Dioxygenasen lösliche Enzyme (Britsch, 1990; Prescott und John, 1996), die beide Atome des elementaren Sauerstoffes in Substrate einbringen. Dabei wird formal ein Sauerstoffatom auf

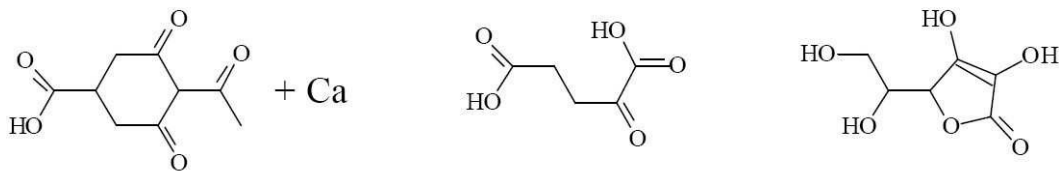
das Substrat übertragen, während das zweite Sauerstoffatom zur oxidativen Decarboxylierung des Kosubstrates 2-Oxoglutarat genutzt wird. Unter Abspaltung von Kohlendioxid entsteht dabei Succinat (De Carolis und De Luca, 1994; Bugg, 2001).

Trotz Unterschieden in den katalytischen Reaktionen der 2-ODDn folgt die Sauerstoffaktivierung einem Schema: Die Enzyme binden über das HxD(53-57)xH-Motiv und 2-Oxoglutarat zunächst Eisen(II) (Prescott and Lloyd, 2000), gefolgt von molekularem Sauerstoff in tetraedrischer Koordination zum Eisen(II)ion. Die homolytische Spaltung des Sauerstoffmoleküls und die Übertragung eines Atoms auf 2-Oxoglutarat unter Abspaltung von Kohlendioxid liefert ein hoch reaktives Eisen(IV)-Intermediat (aktive Ferryl-Spezies), das neben den Aminogruppen der Liganden auch durch die Carboxylgruppe des Succinats stabilisiert wird. Der aktivierte Sauerstoffatom-Eisenkomplex abstrahiert ein Wasserstoffatom vom Substrat und liefert ein Hydroxylradikal an das Substratradikal. Das hydroxylierte Substrat kann z. B. unter Ringschluss oder Wasserabspaltung zur Einführung einer Doppelbindung weiterreagieren (Zhang, et al., 1997; Schofield und Zhang, 1999; Prescott und Lloyd, 2000; Clifton et al., 2001 Turnbull et al., 2004; Wellford et al., 2005).

Die Beteiligung von Eisen(II)ionen und der radikalischen Intermediate legen nahe, dass 2-ODDn häufig starken oxidativen Bedingungen ausgesetzt sind, die das Enzym leicht schädigen können. Sie benötigen zur Stabilisierung der daraus resultierenden Empfindlichkeit unbedingt einen wirksamen Oxidationsschutz. Aus diesem Grund und zur Erhaltung der Oxidationsstufe des Eisen(II)ions werden den Reaktionen Ascorbat oder Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Die Zugabe von Ascorbat kann aber auch zur unabhängigen Decarboxylierung des 2-Oxoglutarats führen. In dieser Reaktion wird das reaktive Sauerstoffatom der aktiven Ferryl-Spezies nicht auf das Substrat, sondern auf Ascorbat unter Bildung einer Peroxidverbindung übertragen (Clifton et al., 2006). Diese Reaktion häuft sich bei Substratmangel oder bei Mutationen in der genetischen Information des Enzyms (Myllyharju und Kivirikko, 1997). Durch Zugabe von Catalase können Peroxid-Verbindungen gespalten und kann die Aktivität der Enzyme erhöht werden (Kondo et al., 1981; Britsch und Griesbach, 1996). Ohne einen antioxidativen Schutz oder Spaltung von Peroxiden geht die Aktivität von 2-ODDn durch autokatalytische Degeneration schnell verloren (Smith et al., 1994; Barlow et al., 1997).

Aufgrund der komplexen Bindung verschiedener benötigter Substanzen kann die katalytische Aktivität der 2-ODDn auf unterschiedliche Weise inhibiert werden. In Studien

wurde die Auswirkung verschiedener Strukturen mit Ähnlichkeit zu den Kofaktoren auf die Enzymaktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass wenige zweiwertige Kationen rudimentär die Funktion des Eisen(II)ions übernehmen können. Im Vordergrund steht jedoch die Hemmung der Enzymaktivität. Auch der Einsatz verschiedener 2-Oxosäuren und 2-Oxoglutarat-Analoga zeigt einen deutlich verminderten Umsatz des Substrates (Halbwirth et al., 2006; Knott, 2004; Britsch und Grisebach, 1986). Einer der bekanntesten 2-ODD-Inhibitoren ist der sehr effektive Inhibitor Prohexadion, der als Inhibitor der wachstumsfördernden Gibberellinsäuren entwickelt wurde und zur Hemmung des Längenwachstums sowie zur Feuerbrandresistenzsteigerung von Obstbäumen eingesetzt wird (Peterek, 2004).



**Abbildung 7**

Chemische Struktur von Prohexadion-Ca (links), 2-Oxoglutarinsäure (Mitte) und Ascorbinsäure (rechts) (nach Peterek, 2004)

## II. Ziel der Arbeit

Das Flavonoid-Spektrum von *E. arvense* ist weitgehend bekannt, jedoch fehlen Studien zu den relevanten Enzymen. Schwerpunkt dieser Dissertation sollte sein, die Erkenntnisse zu bereits bekannten 2-ODDn aus anderen Pflanzen in Bezug auf die Flavonoid-Biosynthese in *E. arvense* zu prüfen. Anschließend sollen die Ergebnisse mit den Annahmen des aktuellen Forschungsstandes verglichen werden. Das Herausarbeiten von Unterschieden und der Vergleich der erhaltenen mit bereits bekannten Sequenzen eröffnet aufgrund des evolutionären Alters der Pflanze eine gute Möglichkeit, die Entwicklung der 2-ODDn phylogenetisch näher zu betrachten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Charakterisierung der FNS aus *E. arvense* gerichtet. Vorversuche hatten einen Hinweis auf die Expression von FNS I ergeben, die bisher nur aus wenigen Arten der Apiaceae nachgewiesen worden war (Martens et al., 2001; Gebhardt et al., 2005). Durch Charakterisierung der Enzymreaktion, Produktanalyse und Hemmstoff-Versuche mit verschiedenen Analysemethoden soll diese Vermutung verifiziert werden. Letztlich wurde die Klonierung der cDNA der verantwortlichen Enzyme sowie deren rekombinante, heterologe Expression angestrebt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit betraf die Akkumulation roter Farbstoffe in Petersilie, die nur unter Stress zu beobachten sind. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den Farbstoffen um Anthocyane handelt. Aufgabe war es, diese Annahme zu bestätigen, das Muster der Anthocyane zu bestimmen und die *de novo* Synthese unter Stress nachzuweisen. Dies sollte neben nasschemischer Inhaltsstoffanalyse auch molekulargenetisch auf Expressionsebene verifiziert werden. Nach Klonierung der ANS als zentralem Enzym der Anthocyanidin-Biosynthese sollte diese charakterisiert werden. ANS gehört zu den 2-ODDn und zeigt entsprechend große Verwandtschaft zur FLS. Damit besteht die Möglichkeit, dass eine multifunktionale FLS für die Anthocyanidin-Bildung verantwortlich ist. Hier bestand die Aufgabe deshalb darin, nach Klonierung und Expression des verantwortlichen Enzyms durch Analyse der genetischen Information und Charakterisierung der Enzymfunktion eine eindeutige Zuordnung als ANS und eine Abgrenzung zur FLS zu ermöglichen.



### III. Material und Methoden

#### 1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Hybond N Membran	GE Healthcare, München
Aminosäuren für SC-U Medium	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Arabinose	Roth, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym, Oldendorf
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Roth, Karlsruhe
Celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dowex, 1x2-400 ion-exchange resin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
D-Galactose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Glasbeads, unwashed, 425-600µm	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
ImmobilonP PVDF-Membran für Western Blot	Millipore, Schwalbach
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 471 Marker, 13	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Micro Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Molecular Weight Marker SDS7	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Molecular Anti-poly Histidine	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Phenol, gesättigt mit 0,1M Citrat-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Rinderserum Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Seesand	Merck, Darmstadt
Spectinomycin	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Tris Pufferan	Roth, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base without amino acids	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Roth, Sigma oder Fluka in analysenreiner Qualität bezogen.

### 1.1. Radiochemikalien

[2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von 53 mCi/mmol wurde von Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) bezogen, welches zur Synthese mit „kaltem“ Malonyl-CoA auf 60000 dpm/nmol verdünnt wurde. Mit diesem Substrat wurde [<sup>14</sup>C]NAR mit einer spezifischen Aktivität von 0,095 µCi/nmol enzymatisch selbst herstellt. [<sup>14</sup>C]NAR wurde nach Bedarf enzymatisch zu weiteren Substraten (DHK, ERI, DHQ) umgesetzt.

Von Hartmann Analytic (Braunschweig) wurde [α-<sup>32</sup>P]dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 400µCi/mmol erworben.

### 1.2. Enzyme

Alle Enzyme für molekularbiologische Versuche wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

### 1.3. Reagenziensätze (Kits)

Gateway LR Clonase EnzymeMix	Invitrogen, Karlsruhe
Nucleospin Extract	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Plant RNA Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare, München
<i>S. c.</i> EasyComp Transformation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 1.4. Substrate, Kosubstrate und Referenzsubstanzen

Als Kosubstrate wurden 2-Oxoglutarat von Merck (Darmstadt) und Ammonium Eisen(II)sulfat, Natriumascorbat und NADPH von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Als Substrat bzw. Referenzsubstanz wurde NAR bei Sigma (Deisenhofen) erworben. DHK, LPg und LCy wurden von der TransMIT (Projektbereich Flavonoidforschung) erworben. Alle weiteren als Substrat bzw. als Referenzsubstanz benötigten Flavonoide (ERI, DHQ, Qu, Lu, Ap, Km, Pg, Cy) wurden bei Extrasynthese (Genay, Frankreich) oder Sigma-Aldrich/Fluka (Steinheim) bezogen.

## 2. Lösungen, Puffer und Medien

### 2.1. Lösungen für die Bakterientransformation

Lösung 1	100 mM Magnesiumchlorid-Lösung
Lösung 2	100 mM Calciumchlorid-Lösung mit 15 % Glycerol

**2.2. Puffer für die Isolierung von Plasmid DNA**

GTE-Puffer	50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,02 mg RNase/ml
Lysepuffer	0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)
PA-Lösung	5 M Kaliumacetat (pH 4,8)

**2.3. Lösungen für die Isolierung von genomischer DNA**

Extraktionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 500 mM NaCl
50 TE	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
SDS-Lösung	20 % SDS (pH 7,2)
KAc-Lösung	5 mM Kaliumacetat
NaAc-Lösung	3 mM Natriumacetat

**2.4. Lösungen für die Isolierung von GesamtRNA nach Chomczynski und Sacchi (1987)**

Lösung D	4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0), 0,5 % Laurylsarcosin
NaAc-Lösung	2 M Natriumacetat (pH 4)

**2.5. Puffer für den Bakterien- bzw. Hefeaufschluss**

Aufschlusspuffer I	100 mM Tris-HCl (pH 7,0)
Aufschlusspuffer II	100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0)
Aufschlusspuffer III + IV	Entsprechen jeweils Aufschlusspuffer I + II mit zusätzlich 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 0,2 % (w/v) Natriumdesoxycholat

Aufschlusspuffer GW	50 mM Kaliumphosphatpuffer, 400 mM Natriumchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 10 mM Imidazol, pH 7,8
---------------------	--

## 2.6. Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 8 % (v/v) Glycerin, 6 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
5 x Elektrodenpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 8,9, 76 g/l Glycin, 10 g/l SDS
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärberlösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Trenngel (12,5 %ig)	4,1 ml 30 % wässrige Acrylamid-Lösung, 400 µl 10 % SDS-Lösung, 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,0 ml dest. Wasser, 16 µl TEMED, 70 µl 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung
Sammelgel (5 %ig)	375 µl 30 % wässrige Acrylamid-Lösung, 100 µl 10 % (m/v) SDS-Lösung, 625 µl Sammelgelpuffer, 1,4 ml dest. Wasser, 5 µl TEMED, 15 µl 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung

## 2.7. Puffer für Western Blot

Anodenpuffer I	0,3 M Tris-HCl (pH 10,4), 10 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl (pH 10,4), 10 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 9,4), 10 % (v/v) Methanol, 40 mM Amminohexansäure
PBS-Puffer	2,7 mM Kaliumchlorid, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
PBS-Blockierungslösung	PBS-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver

PBS-Tween-Puffer	PBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) TWEEN 20
Farbreaktionspuffer	1 M Tris-HCl (pH 8,8), 1 mM Magnesiumchlorid

## 2.8. Puffer für die Proteinreinigung

Für die Aufreinigung mittels His-Tag:

Aufschlusspuffer GW	50 mM Kaliumphosphatpuffer, 400 mM Natriumchlorid, 100 mM Kaliumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 10 mM Imidazol, pH 7,8
Aufschlusspuffer His-Tag	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol, pH 8,0 mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 0,2 % (w/v) Natriumdesoxycholat
Bindepuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Für die Aufreinigung aus dem Proteinrohextrakt der Pflanzenaufarbeitung:

Puffer A	200 mM Kaliumphosphatpuffer, 10 % (v/v) Glycerol, 1 M Ammoniumsulfat, pH 6,0
Puffer B	200 mM Kaliumphosphatpuffer, 10 % (v/v) Glycerol, pH 6,0
Puffer C	200 mM Kaliumphosphatpuffer, 10 % (v/v) Glycerol, 1 M Natriumchlorid, pH 6,0
Puffer D	200 mM Kaliumphosphatpuffer, 10 % (v/v) Glycerol, 2 mM 2-Oxoglutarat, pH 6,0
Puffer E	200 mM Kaliumphosphatpuffer, 10 % (v/v) Glycerol, 10mM 2-Oxoglutarat, pH 6,0
Puffer F	20 mM Kaliumphosphatpuffer, 20 mM Natriumascorbat, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,0

Puffer G	50 mM Natriumphosphatpuffer, 500 mM Imidazol, 300 mM Natriumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol, 20 mM Natriumascorbat, pH 8,0
----------	---

## 2.9. Puffer und Lösungen für das cDNA-Bank Screening

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
SM-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M Natriumchlorid, 8 mM Magnesiumsulfat, 0,01 % (w/v) Gelatine
20 x SSC-Puffer	3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Prehybridisierungspuffer	250 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 250 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS
Stripping-Puffer	0,1 x SSC-Puffer mit 0,1 % (w/v) SDS
Denaturierungslösung	0,5 M Natriumhydroxid, 1,5 M Natriumchlorid
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 M Natriumchlorid
Waschlösung	200 mM Tris-HCl (pH 7,5)

## 2.10. Sonstige Puffer und Lösungen

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 1 % (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,3
Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser

## 2.11. Hefemedien

SC-U	6,7 g/l Yeast Nitrogen Base, je 0,1 g/l: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, je 0,05 g/l: Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin, 20 g/l Glucose
------	--

YPGE	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, 3 % (v/v) Ethanol
------	--

### 2.12. Bakterienmedien

LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1ml/l 1 M Magnesiumsulfat-Lösung, 2 ml/l Glycerin, pH 7,5
LB-Medium fest	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
SOC-Medium	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/L Natriumchlorid, 20 mM Glucose

### 2.13. Medien für das cDNA-Bank Screening

LB Broth	10 g/l Natriumchlorid, 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,0
LB Broth supplementiert	LB Broth mit 10 mM Magnesiumsulfat, 6 mM Maltose
NZY Broth	5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ-Amine, 5 g/l Natriumchlorid, 2g/l Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O, pH 7,5
NZY Agar	NZY Broth mit 15 g/l Bacto-Agar
NZY Top Agar	NZY Broth mit 0,7 % (w/v) Agarose

### 2.14. In Medien verwendete Antibiotika

#### Stocklösungen:

Ampicillin	100 mg/l
Kanamycin	50 mg/l
Spectinomycin	100 mg/l
Tetracyclin	15 mg/l



### 2.15. Pflanzenmedien

#### Stammlösungen:

Makroelemente (einzelne Lösungen)	250,0 g/l Kaliumnitrat, 25,0 g/l Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O, 17,2 g/l Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O, 15,0 g/l Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O, 13,4 g/l Ammoniumsulfat, 2,56 g/l Eisensulfat x 7 H <sub>2</sub> O zusammen mit 3,43 g/l Dinatrium-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O
Mikroelemente (eine Lösung)	300 mg/l Borsäure, 300 mg/l Zinksulfat 7 x H <sub>2</sub> O, 100 mg/l Mangansulfat x H <sub>2</sub> O, 75 mg/l Kaliumjodid, 25 mg/l Natriummolybdat x 2 H <sub>2</sub> O, 25 mg/l Kupfersulfat x 5 H <sub>2</sub> O, 25 mg/l Kobaltchlorid x 6 H <sub>2</sub> O
Vitamine (eine Lösung)	10 mg/ml Thiamindichlorid, 1 mg/ml Pyridoxin-HCl, 1 mg/ml Nicotinsäure
Hormon-Lösungen	0,2 mg/ml Kinetin 0,5 mg/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

#### Medien:

B5 (1 l)	Je 10 ml der Makroelemente-Lösungen, 10 ml Mikroelemente-Lösung, 1 ml Vitamine-Lösung, 2 ml 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure-Lösung, 0,5 ml Kinetin-Lösung, 100 mg Myo-Inosit, 20 g Saccharose, pH 5,8
CB-2-OH fest	Je 10 ml der Makroelemente-Lösungen, 10 ml Mikroelemente-Lösung, 1 ml Vitamine-Lösung, 100 mg Myo-Inosit, 20 g Saccharose, 2 g NZ-Amine, 1 % (w/v) Agar, pH 5,5

Für Stressversuche wurden die Medien wie folgt variiert:

Für stickstofffreies B5- oder CB-2-OH-Medium wurde Kaliumnitrat und Ammoniumsulfat gegen 17,7 g/l Kaliumsulfat ersetzt und das CB-2-OH-Medium ohne NZ-Amine hergestellt. Desweiteren wurde das B5-Medium zur Simulation eines Trockenstresses mit 20 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 6000 hergestellt. Beide Medien wurden auch jeweils zur Simulation eines Trockenstresses bzw. eines osmotischen Stresses mit 43,7 g/l Mannit, 10 mM Abscisinsäure oder 250 mM Natriumchlorid versetzt.

### 3. Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne 131</i> (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 AI	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm araB: :T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Top10	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
M15 [pREP4]	<i>Nal<sup>r</sup> str<sup>r</sup> rif<sup>r</sup> thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup> [pREP4 Kan<sup>R</sup>]</i>	Qiagen GmbH, Hilden
XL1 Blue MRF'	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagen (La Jolla, CA, USA)
INVSc1	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

### 4. Vektoren

#### 4.1. Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden in die Klonierungsvektoren pCR2.1 TOPO TA oder pCR8 TOPO/GW/TA von Invitrogen (Karlsruhe) sowie in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1 TOPO TA Invitrogen (Karlsruhe) kloniert.

#### 4.2. Vektoren für die Klonierung in *Enterobacteria phage lambda*

Die cDNA-Bank wurde von der Firma Vertis Biotechnologie AG (Freising) in *Enterobacteria phage lambda* mit dem Vektor pExCell (Amersham, GE Healthcare, München) hergestellt.

**4.3. Vektoren für die Expression in *E. coli***

pDEST14	Invitrogen (Karlsruhe)
pDEST17	Invitrogen (Karlsruhe)
pET15b	Novagen, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt
pETDuet-1	Novagen, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt
pQE70	Qiagen GmbH, Hilden

**4.4. Vektoren für die Expression in *S. cerevisiae***

pYES2	Invitrogen (Karlsruhe)
pYES2.1 TOPO TA	Invitrogen (Karlsruhe)
pYES-DEST52	Invitrogen (Karlsruhe)

**5. Geräte**

Agarosegel-Apparatur	Agagel Mini Biometra	Biomed. Analytik GmbH, Göttingen
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH Labor- Systemtechnik, Wettenberg
Bioimaging Analyzer	BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer	Fuji Photo Film, Tokyo/Japan
Software	AIDA Version 4.15	Raytest, Straubenhardt
Crosslinker	UV Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam/NL
FPLC		Pharmacia, Freiburg
Controler	LCC-500	Pharmacia, Freiburg
Pumpe	P-500	Pharmacia, Freiburg
HPLC	Merck D- 7000 HSM	Merck, Darmstadt
Säule	Nucleodur 125/4 Spinx RP 5 µm	Macherey-Nagel, Düren
Pumpe	L-6200 A	Merck, Darmstadt

Autosampler	AS-4000	Merck, Darmstadt
UV-Detector	L-4500	Merck, Darmstadt
Hybridisierungssofen	Hybridisationsoven 6/12	Uni Equip, Martinsried
PAGE-Apparatur	Miniprotean II, 2D Multicell	Biorad, München
PCR-Geräte	Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
	Robocycler Gradient 96	Stratagene, Amsterdam/NL
Photodokumentation für Agarosegele	QuickStore plus	RS-Laborgeräte, Gmünd
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
	Spektralphotometer UV 1602	Shimadzu, Kyoto/Japan
Semi Dry Blot Apparatur	Sammy Dry	Schleicher & Schuell, Dassel
Szintillationszähler	1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter	Wallack, Turku/Finland
Thermomixer	Thermomixer comfort und 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor	UP 200S	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Wasserreinigungsanlage	Milli RX 20	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge	Sorvall RMC 14	DuPont, Newton/USA
Tischzentrifugen	Sorvall RC plus Zentrifuge	DuPont, Newton/USA
	Biofug pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau

## 6. Gewinnung des Pflanzenmaterials

Die untersuchten sterilen Sprosse des Ackerschachtelhalms (*E. arvense*) stammten aus einer Wildsammlung im Alten Botanischen Garten der Philipps-Universität Marburg. Die Petersilienpflanzen (*P. crispum*) wurden in der zum Institut gehörenden Gärtnerei gesät und unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Die Petersilienzellkulturen stammten aus der Institutssammlung.

## 7. Stressversuche an *P. crispum*

Petersilienpflanzen oder -zellkulturen wurden verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt. Die Pflanzen wurden mehrere Tage entweder bei einer Tagtemperatur von ca. 40°C oder in einem Kühlraum bei 4°C kultiviert. In weiteren Versuchen bei Raumtemperatur wurden die Petersilienpflanzen mit Starklicht (9 Leuchtstoffröhren Philips TL-D/25, 18 Watt, Länge 60 cm, Abstand zu den Kulturen ca. 60 cm) bestrahlt oder unter völligem Lichtausschluss gehalten. In diesen Versuchen wurden die Pflanzen zweimal in der Woche gegossen und zu den Gießzeiten auf Verfärbungen untersucht. Parallel wurden Petersilienpflanzen unter Wasser- oder Trocken- bzw. Salzstress gesetzt. Dazu wurden die Pflanzen nicht gegossen, bis der Turgor der Pflanze deutlich abgenommen hatte, diese aber noch grün und nicht zu welk waren. Anschließend wurde die Pflanze wieder gegossen und nach Erholung auf Verfärbungen untersucht. Alternativ wurden die Pflanzen täglich gegossen oder dem Gießwasser Natriumchlorid (250 mM) zugesetzt und auch hier jeweils zweimal wöchentlich auf Verfärbungen untersucht.

Zellkulturen wurden standardmäßig propagiert, in dem wöchentlich 5 g der Zellen (Feuchtgewicht) in einen Kolben mit 50 ml frischem Medium überführt wurden. Zur Auslösung von osmotischem Stress wurde den Kulturmedien Abscisinsäure (10 mM) oder Natriumchlorid (250 mM) zugegeben. Zur Induktion eines Wassermangels in den Zellkulturen wurde das Medium mit PEG 6000 (20 % (w/v)) oder Mannit (43,7 g/l) versetzt. Für diese Versuche wurden je sieben Kulturen eingesetzt, von denen pro Tag ein Kolben geerntet und die abzentrifugierten Zellen auf Inhaltsstoffe analysiert wurden.

## 8. Chemische Methoden

### 8.1. Extraktion und Analyse von Flavonoiden aus Pflanzen

Pflanzenmaterial wurde entweder frisch geerntet oder nach einer Lagerung bei -80 °C verwendet. Das Gewebe (200 mg) wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml Methanol oder Methanol/4 N Salzsäure (1:1) unter kräftigem Schütteln extrahiert und dann

bei 4 °C dunkel gelagert. Nach 24 h wurden die Pflanzenreste abzentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

Die Absorptionen der Extrakte wurden am Spektralphotometer im Wellenlängenbereich von 400-800 nm gegen Methanol/4 N Salzsäure (1:1) ermittelt. Anschließend wurde die Hälfte des Methanol/HCl Extraktes 15 min bei 95 °C hydrolysiert und nochmals vermessen. Nach dieser zweiten Messung wurden die Lösungen zur Trockne eingengt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Ein Viertel dieses Extraktes wurde durch Cellulose-DC und Vergleich mit authentischen Standards analysiert.

## 8.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Analyse wurden Cellulose-Platten ohne Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt) und die Laufmittel A, B (bevorzugt für Flavanone, Dihydroflavonole, Flavonole und Flavone), C, D (bevorzugt für Anthocyanidine) und E bis I (bevorzugt für die allgemeine Trennung von Flavonoiden) verwendet.

A	Chloroform: Essigsäure: Wasser (CAW)	50:45:5
B	30 % (v/v) wässrige Essigsäure	
C	Essigsäure: Salzsäure: Wasser (Forestal)	30:3:10
D	Butanol: Essigsäure: Wasser (BAW)	6:1:2
E	15 % (v/v) wässrige Essigsäure	
F	Ameisensäure: Salzsäure: Wasser (Formic)	5:2:3
G	Essigsäure: Wasser: Ethylacetat: 1-Propanol	1:30:40:40
H	Obere Phase von Ethylacetat: Wasser: n-Butanol	25:50:1
I	Wasser: Methanol: Chloroform	2:18:8

Zur Detektion wurden die DC-Platten mit Natriumborhydrid-Lösung (100 mg Natriumborhydrid in 1 ml Wasser gelöst und mit 9 ml Isopropanol gemischt) besprüht, mit rauchender Salzsäure bedampft und dabei die Rückseite der Platte mit heißer Luft erwärmt oder mit Naturstoffreagenz A (100 mg Diphenylborsäure- $\beta$ -aminoethylester Komplex in 10

ml Ethanol) besprüht. Die Auswertung erfolgte im Tageslicht oder unter UV-Bestrahlung (Jork et al., 1989; Wollenweber, 1982).

### **8.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde nach Akashi et al. (1998) durchgeführt. Die Substanzen wurden auf einer reversed-phase Säule (5 µm Nucleodur 125/4 Spinx RP, Macherey-Nagel, Düren) über 30 min isokratisch (40 % wässriges Methanol mit 3 % Essigsäure) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min getrennt. Die Proben wurden in Fließmittel gelöst eingespritzt und die Elution mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei 220-400 nm verfolgt.

### **8.4. Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie (UPLC-MS)**

Die Analyse mittels UPLC-MS wurde von Domenico Masuero und Mattia Gasperotti am Istituto Agrario di San Michele all'Adige (IASMA) der Fondazione Edmund Mach in Italien durchgeführt. Zur detaillierten Produktcharakterisierung wurde ein Waters Acquity HDMS-QTOF Synapt (Waters Corp., Millford, MA) Massenspektrometer mit Electrospray-Ionisierungssystem (ESI) und die MassLynx Software 4.1 (Waters Corp., Millford, MA) verwendet.

Die Trennung wurde mit einer auf 30 °C temperierten UPLC-Säule (Acquity UPLC HSS T3; 1,8 µm 150x2,1 mm/Waters Corp., Millford, MA) und den Laufmitteln 0,1 % wässrige Ameisensäure (A) und 0,1 % Ameisensäure in Methanol (B) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min durchgeführt. Es wurden 10 µl konzentrierte Probe eingespritzt und die Trennung in Laufmittel A, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 100 % Laufmittel B über 6 min und abschließend 100 % Laufmittel B über 4 min durchgeführt. Nach Abschluss der Trennung wurde die Säule in 3 min wieder mit 100 % Laufmittel A äquilibriert. Die Substanzen wurden mit einer MS-Scanweite von 50-3000 Da bei alternierender Polarität vermessen.

## 9. Molekularbiologische Methoden

### 9.1. Oligonucleotid-Primer

Oligonucleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Die Primer-Sequenzen mit einer Schmelztemperatur von 50-60 °C wurden nach dem Programm Oligonucleotide Properties Calculator entworfen (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Degenerierte Primer für 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese wurden nach Martens et al. (2003) und Gebhardt et al. (2005) synthetisiert. Für die Amplifikation eines cDNA-Fragmentes der DFR aus *Petersilie* wurden degenerierte Primer nach Helariutta et al. (1992) verwendet. Das 3'-Ende der cDNA-Sequenz der ANS aus *Petersilie* wurde mit selbst entworfenen, degenerierten 3'-RACE-ANS-Primern kloniert. Stark konservierte Bereiche in ANS-Sequenzen wurden durch Sequenzvergleich ermittelt und für die Primer-Synthese genutzt. Weniger konservierte Basen in diesen Bereichen wurden durch sogenannte „Wobble“-Basen ersetzt.

### 9.2. Agarose-Gelelektrophorese

RNA- bzw. DNA-Fragmente wurden in 1-2 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Agarose wurde unter Erwärmen in 1 x TAE Puffer gelöst, mit 5 % Ethidiumbromid versetzt und in eine vorbereitete Form gegossen. Ein eingetauchter Kamm erzeugte für den Probenauftrag Taschen im erstarrten Gel. Das Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gelegt und vollständig mit 1 x TAE Puffer bedeckt. Die Proben wurden nach Zusatz von Glycerin-Probenpuffer in die Taschen pipettiert und bei 120 V (in Richtung Kathode) aufgetrennt. Der Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in DNA und RNA und der angereicherte Farbstoff erlaubt die Detektion der Fragmente unter UV-Bestrahlung. Ein parallel aufgetragenes Gemisch von DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge (Leiter) ermöglicht die Größenzuordnung sowie die Abschätzung der DNA- bzw. RNA-Mengen.



### 9.3. Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung folgte in abgewandelter Form dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Dazu wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert, 50 mg des pulverisierten Materials in ein vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß eingewogen und in 500 µl Lösung D suspendiert (III.2.4.). Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur zur Denaturierung der Proteine, v. a. der RNasen, wurden 50 µl Natriumacetat-Lösung zugegeben und vorsichtig durch Invertieren des Reaktionsgefäßes durchmischt. Anschließend wurden 500 µl Citratpuffer-gesättigte Phenol-Lösung zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem Chloroform wurde der Ansatz intensiv geschüttelt, bis er milchig wurde und 15 min auf Eis inkubiert.

Etwa 400 µl des wässrigen Überstandes nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12.000 g wurden in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das gleiche Volumen (ca. 400 µl) Isopropanol (-20 °C) zugesetzt und auf Eis für weitere 15 min inkubiert. Die ausgefällten Ribonucleinsäuren wurden durch Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 12.000 g pelletiert, der Überstand entfernt und zunächst mit 70 % Ethanol und anschließend mit 100 % Ethanol gewaschen.

Nach der Trocknung des RNA-Pellets für ca. 5 min bei 37 °C wurde es in 20 µl Wasser gelöst. Zur Erhöhung der Löslichkeit wurde der Ansatz auf 50 °C erwärmt und ein Aliquot (1 µl) verdünnt mit 50 µl Wasser zur Konzentrationsbestimmung mit dem Eppendorf Biophotometer eingesetzt. Weitere 4 µl wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die isolierte RNA auf Verunreinigungen mit DNA zu kontrollieren.

Alternativ wurde die Gesamt-RNA aus Ackerschachtelhalm auch mit dem Plant RNA Reagent Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben isoliert. Die Gehalts- und Reinheitsprüfung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### 9.4. cDNA-Bank

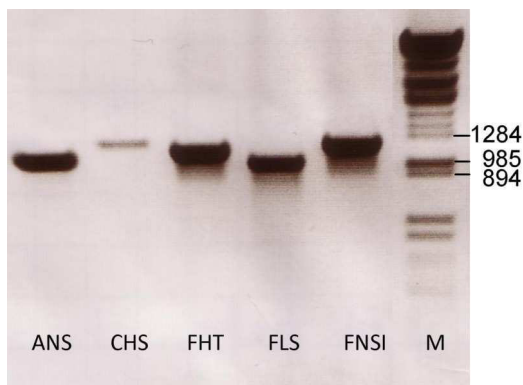
Eine cDNA-Bank soll die gesamte mRNA eines Organismus oder eines Gewebes repräsentieren. Dazu wurde die Gesamt-mRNA zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, diese mit einer DNA Polymerase I zu

cDNA-Doppelstränge vervollständigt, in Plasmide ligiert und diese Plasmide in perforierten Phagen eingeschleust.

Die hier untersuchte cDNA-Bank wurde von der Firma Vertis Biotechnologie AG (Freising) aus selbst isolierter Gesamt-RNA von *E. arvense* mit dem Plasmid pExCell und  $\lambda$ -Phagen hergestellt. Die Analyse der cDNA-Bank wurde in Anlehnung an das Protokoll des ZAP-cDNA Synthesis Kits von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

#### 9.4.1. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Die cDNA-Sequenzen von CHS aus *E. arvense* (EaCHS), FLS, FHT und FNS aus *P. crispum* (PcFLS, PcFHT, PcFNS) sowie ANS aus *Gerbera hybrida* (GhANS) wurden mittels RT-PCR in voller Länge von entsprechender mRNA amplifiziert (Abbildung 8). Die amplifizierte DNA wurden mit TE Puffer auf eine Konzentration von jeweils 25 ng in 45  $\mu$ l verdünnt und mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP und Rediprime II DNA Labeling Kit (GE Healthcare, München) markiert.



**Abbildung 8**

PCR-Amplifizierung der Volllängen-cDNA-Sequenz zur Sondenbildung.

ANS wurde aus *Gerbera*, CHS aus Ackerschachtelhalm und FHT, FNS I und FLS aus Petersilie amplifiziert.

Die Amplifikate wurden mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP markiert und als Sonden eingesetzt.

Die Markierungsreaktion wurde durch Zusatz von 0,2 M EDTA-Lösung beendet und überschüssiges [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP durch Gelfiltration über Sephadex G50 entfernt. Dazu wurde das Säulenmaterial in TE Puffer suspendiert und zu einem Bettvolumen von 1 ml in Pasteurpipetten gefüllt. Der Reaktionsansatz wurde aufpipettiert, die Säule mit 500  $\mu$ l TE Puffer gewaschen und anschließend elfmal mit je 100  $\mu$ l TE Puffer eluiert. Jede Fraktion wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen, die Säule abschließend zweimal mit je 500  $\mu$ l TE Puffer gewaschen und die Radioaktivität je 5  $\mu$ l aller 14 Fraktionen mit dem Szintillationszähler bestimmt.

Die zum ersten Radioaktivitätsgipfel korrespondierenden Fraktionen (höhere Molekülgröße) wurden vereinigt und als Sonde für die Hybridisierung genutzt.

#### 9.4.2. Titerbestimmung

Der Titer gibt an, wie viele rekombinante Phagen (= plaque forming units = PFU) in 1 µl Stammlösung der cDNA-Bank vorhanden sind. Zur Bestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der cDNA-Bank hergestellt, wie in den Screenings ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Plaques im Bakterienrasen ausgezählt werden. Auf diese Weise konnte die notwendige Verdünnung bestimmt werden, um ca. 10.000 PFU pro Platte mit einem Durchmesser von 8 cm zu erhalten. Die Stammlösung der Ackerschachtelhalm-cDNA-Bank musste für ausreichende, aber nicht zu dichte, Plaque-Dichte 1:50.000 mit SM-Puffer verdünnt werden.

#### 9.4.3. Screening

##### *Ausplattieren der λ-Phagen mit XL1 Blue MRF'-Bakterien*

Für das Ausplattieren wurden zunächst 20 Petrischalen mit NZY Agar (8 cm Durchmesser) im Brutschrank bei 37 °C vorgewärmt. Bei 1.000 x g wurde die 50 ml Übernachtskultur der XL1 Blue MRF' Zellen in supplementiertem LB Broth-Medium bei 4 °C über 10 min abzentrifugiert und in 10 ml 10 mM Magnesiumsulfat-Lösung resuspendiert (III.2.13.). Nach Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurde die Bakteriensuspension auf eine Arbeitskonzentration von OD<sub>600</sub> = 0,5 verdünnt und auf Eis steril bis zur Weiterverwendung gelagert. Die Phagen-Stammlösung der cDNA-Bank wurde auf die berechnete Konzentration verdünnt (III.9.4.2) und ebenfalls steril auf Eis gelagert. NZY-Top-Agar wurde verflüssigt und auf ca. 40 °C temperiert, damit die Agarose nicht wieder gelierte (III.2.13.).

Sterile Kulturröhrchen (20 Stück) wurden mit Bakteriensuspension und Phagensuspension mit jeweils 100 µl beschickt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden etwa 4 ml NZY-Top-Agar zugegeben, die Suspension sofort auf vorgewärmten NZY-Agar-Platten ausplattiert, die Platten nach Verfestigung des Top-Agars mit Nescofilm (Roth, Karlsruhe) verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### *Plaque lifting*

Für das „Plaque lifting“ durch Abdruck wurden Hybond N Membran (ungeladene Nylon Transfermembran, GE Healthcare, München) durch Ausstanzen von kleinen Lochmustern und Nummerierung für jede Platte markiert. Die Membranen wurden für 2 min glatt auf die Plattenkulturen gelegt und die Markierungen für die spätere Zuordnung auf den Petrischalen vermerkt. Nach Abziehen der Membranen ohne Beschädigung der Top-Agar-Schicht blieb die obere Phagenschicht der über Nacht entstandenen Plaques an den Membranen haften. Diese wurden zur Ausfällung der Phagenproteinhülle für 2 min in Denaturierungslösung (III.2.9.) inkubiert und somit die DNA der Phagen freigelegt. Anschließend wurden die Membranen 5 min in der Neutralisierungslösung inkubiert und 30 Sekunden mit der Waschlösung gewaschen (III.2.9.). Nach Trocknung wurde die DNA mittels „Crosslinker“ (UV Stratalinker 1800 von Statagene, Amsterdam, Niederlande) auf den Membranen fixiert.

### *Hybridisierung*

Zur Hybridisierung der auf den Membranen fixierten DNA mit radioaktiven Sonden wurden die Membranen an der Innenwand von Inkubationsflaschen ohne Überlappung positioniert, 30 ml Prähybridisierungspuffer zugesetzt und die fest verschlossenen Flaschen in einem Rotationsofen bei 50-60 °C über 2 h inkubiert wurden (III.2.9.).

Die cDNA-Sonde wurde bei 95 °C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um eine Hybridisierung der getrennten DNA-Stränge zu vermeiden. Zur Hybridisierung mit der Phagen-DNA wurde die abgekühlte Sonde unverdünnt zu den Membranen in den Prähybridisierungspuffer gegeben und für 16 h bei 50-60 °C im Rotationsofen weiter inkubiert (III.2.9.). Die Hybridisierungstemperatur im heterologen Screening betrug zunächst 55 °C, wurde jedoch bei weiteren Hybridisierungen zur besseren Bindung auf 50 °C abgesenkt. Im homologen Screening der CHS wurden die Membranen bei 60 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Puffer mit überschüssiger Sonde abgegossen und die Membranen je nach benötigter Waschintensität ein- bis dreimal mit 2 x SSC-Puffer für 30 min im Rotationsofen bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen (III.2.9.).

### *Auswertung und Ausstechen der Plaques*

Die gewaschenen Membranen wurden getrocknet und die Radioaktivitätsverteilung mittels Bioimaging ausgewertet. Anhand der während des „Plaque lifting“ durchgeführten

Markierungen konnten die Signale nun den entsprechenden Plaques zugeordnet werden. Der Top-Agar deutlich positiv hybridisierter Plaques wurde ausgestochen und jeweils in 500 µl SM-Puffer überführt (III.2.9.). Das Gemisch wurde zur Elution der Phagen aus dem NZY-Top-Agar über Nacht bei 4 °C inkubiert.

## 2. Screening

Bei dem 2. Screening wurde die Hybridisierungstemperatur bis zu 1 °C erhöht, um die Selektivität der Sonden-Hybridisierung zu erhöhen und eventuell falsch positive Signale des 1. Screenings zu identifizieren. Die Phagensuspensionen wurden auf ca. 10.000 PFU pro Platte verdünnt. Ausplattieren, „Plaque lifting“, Hybridisierung und Auswertung wurden identisch zum 1. Screening durchgeführt. Da es sich um putativ positive Phagen-Plaques aus dem 1. Screenings handelte, wurden die rekombinanten Phagen nur weiterverwendet, wenn nahezu alle Plaques der Platte im 2. Screening ein positives Signal zeigten. Keine oder nur vereinzelte Signalen wurden als falsch positiv des 1. Screenings gewertet. Von jeder positiv bewerteten Platte des 2. Screenings wurde der Top-Agar dreier Plaques ausgestochen und die Phagen über Nacht bei 4 °C in je 500 µl SM-Puffer (III.2.9.) eluiert.

Die eluierten Phagen wurden als Template mit den Primern ExCellf und ExCellr, die auf dem Phagen-Plasmid binden, in PCR-Reaktionen eingesetzt und so die im Phagen-Plasmid klonierte Sequenz amplifiziert. PCR-Produkte, die der erwarteten Länge entsprachen, wurden zur Sequenzierung eingeschickt und mittels des BlastX-Programms der NCBI-Homepage analysiert.

## 9.5. Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Gesamt-RNA wurde mit einer Reversen Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Anleitung des Herstellers zur Einzelstrang-cDNA reverstranskribiert und diese als Matritze für die PCR-Amplifizierung von cDNA-Abschnitten oder Volllängen-cDNA genutzt. Die PCR wurde routinemäßig in einem totalen Volumen von 50 µl durchgeführt, das 5 µl 10 x Taq-Polymerase-Puffer mit Ammoniumsulfat, 3 µl 25 mM Magnesiumchloridlösung, 1 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl 25 µM Primer für die Hin- und Rückreaktion, 1-5 µl cDNA und 2,5 u Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) in destilliertem, sterilem Wasser enthielt. Der

Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 95 °C denaturiert bevor die Amplifizierung in 15-40 Zyklen von 95 °C für 30 sec, einer variablen Temperatur von 50-60 °C für 1 min (Annealing) und 2 min bei 72 °C (Elongation) durchgeführt wurde. Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer und Amplifikationsziel unterschiedlich gewählt, da die Stringenz der Hybridisierung mit der Temperatur steigt. Durch abschließende Temperaturerhöhung auf das Optimum der *Taq*-Polymerase Aktivität von 72 °C werden optimalen Bedingungen für die Elongation erreicht. Die Amplifikation wurde mit einer verlängerten Elongationsphase für 10 min abgeschlossen.

Konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden, wurde die Konzentration von Magnesiumchlorid variiert, welche die Anlagerung der Polymerase an die DNA-Matrix beeinflusst. Alternativ konnte auch die Konzentration von Primer, Template oder die Temperatur in der Anlagerungsphase optimiert werden.

Proofreading-PCR wurden mit doppelter Primer-Konzentration durchgeführt.

#### 9.6. 3'/5'-RACE (rapid amplification of cDNA-ends)

Die RACE-PCR ist eine Methode, bekannte, unvollständige cDNA-Sequenzen bis zum 3'-Ende bzw. 5'-Ende ihres Templates (mRNA) zu ergänzen. Diese Methode wurde in abgewandelter Form nach einem Protokoll der Nature Publishing Group (2005) durchgeführt.

Für das 3'-RACE wurden zwei genspezifische Primer für Amplifikationen in Leserichtung (5'→3') eines cDNA-Abschnittes hergestellt, um eine nested-PCR durchzuführen. In der ersten Amplifikationsreaktion wurde der in 5'-Richtung des Lesestrangs liegende Primer gemeinsam mit dem oligo(dT)-Anchor-Primer eingesetzt. Die zweite PCR wurde mit dem aufgereinigten, 1:100 verdünnten PCR-Produkt, dem zweiten genspezifischen Primer und dem PCR-Anchor-Primer durchgeführt. Aufgrund der höheren Schmelztemperaturen der Primer in der zweiten nested-PCR konnte die Spezifität durch erhöhte Anlagerungstemperaturen verbessert und der gewünschte Sequenzabschnitt in hoher Konzentration und Reinheit amplifiziert werden.

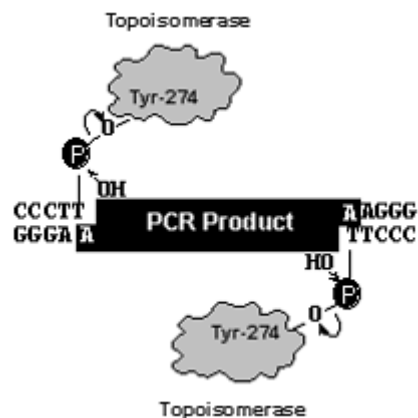
Drei genspezifische Primer zur Gegenstrangsynthese sind für das 5'-RACE notwendig. Der am nächsten zum Stopp-Codon liegende Primer wird zur Synthese eines genspezifischen

cDNA-Fragmentes eingesetzt, welche mittels Terminaler Transferase (Fermentas, St. Leon-Roth) um ein sogenanntes C- bzw. A-Tail am 3'-Ende verlängert wurde. Die anschließende nested-PCR wurde analog des 3'-RACE durchgeführt. Dabei wurde der oligo(dT)-Anchor-Primer im PCR-Ansatz mit C-tailed cDNA durch den AA-Primer ersetzt.

## 9.7. Ligation

Unter einer Ligation versteht man das Einfügen eines DNA-Abschnitts (Insert) in einen linearisierten Vektor unter Verwendung einer Ligase.

Die *Taq*-Polymerase hängt beim Amplifizieren ein überhängendes Adenin an die 3'-Enden des PCR-Produkts. Diese Eigenschaft wird bei TA-Klonierungen von PCR-Produkten ausgenutzt, indem spezielle Vektoren eingesetzt werden, die bereits geöffnet vorliegen und einen Thymin-Überhang besitzen. Während der Ligation hybridisiert das A-Ende des PCR-Produktes mit dem T-Ende des Vektors, welche von der Ligase miteinander verbunden werden.



**Abbildung 9**

TOPO-TA-Kloning eines PCR-Produktes

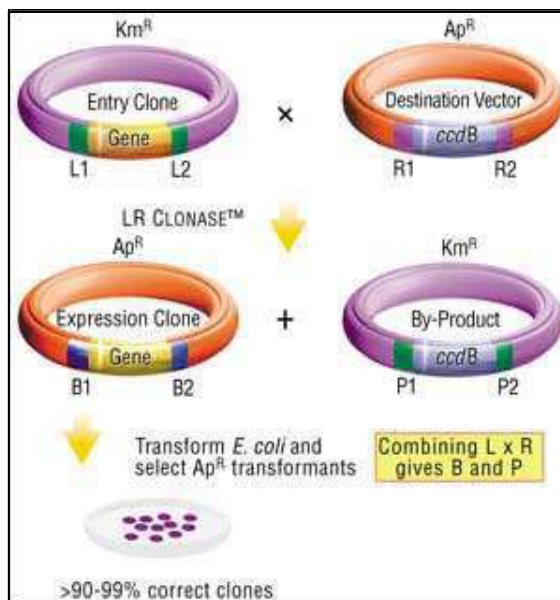
(nach [https://commerce.invitrogen.com/images/iprotocol/Invitrogen/Image/25-0849\\_Vivid\\_Colors/25-0849\\_Topi.gif](https://commerce.invitrogen.com/images/iprotocol/Invitrogen/Image/25-0849_Vivid_Colors/25-0849_Topi.gif))

Bei Klonierungen mit den Vektoren pCR 8, pCR 2.1 und pYES 2.1 wurde keine zusätzliche Ligase benötigt, da eine Topoisomerase aus einem *Vaccinia*-Virus kovalent am 3'-Ende dieser Vektoren gebunden ist, die die Ligase-Reaktion übernimmt (Abbildung 9).

Für das Umklonieren eines Inserts aus einem Klonierungsvektor in einen Expressionsvektor wurden beide Vektoren zunächst mit denselben Restriktionsenzymen

verdaut bzw. das Insert herausgeschnitten. Der Verdau wurde durch Auftrennung im Agarose-Gel überprüft und die Bande des Inserts und des geschnittenen Expressionsvektors aus dem Gel herausgeschnitten, mit dem NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt, eluiert und im Verhältnis 3:1 (Insert:Vector) gemischt. Die im Restriktionsverdau entstandenen Überhänge von Insert und Plasmid hybridisierten und wurden mit T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) bei 22 °C über 16 h ligiert.

Eine Alternative zur klassischen Klonierung mit Restriktionsverdau und Ligation ist die Klonierung mit einem Gateway-System. Hier wird das Insert auf dem Klonierungsvektor („Entry vector“) von attL-sites flankiert, die mithilfe eines Enzym-Mixes erkannt werden. An diesen Stellen wird das Gen aus dem Klonierungsvektor geschnitten und zwischen die attR-sites des Zielvektors („Destination vector“) eingefügt (Abbildung 10). Der Enzym-Mix, hier LR-Clonase (Invitrogen), enthält eine aus Bacteriophagen bekannte Mischung aus Integrase, Integration host factor und Excisionase, die mit Hilfe der oben benannten Erkennungssequenzen die Rekombination der Vektoren katalysiert. Mit Hilfe des Klonierungssystems des pCR8/GW/TOPO/TA („Entry vector“) wurde die Klonierung in die Zielvektoren pDEST14, pDEST17 und pYES-DEST52 nach Herstellerprotokoll durchgeführt.



**Abbildung 10**

Umklonierung mittels  
Gatewaysystem

(nach

<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2000/patton/gateway/LxR.jpg>)



### 9.8. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA-Doppelstränge an definierten Palindromsequenzen, wobei die Produkte 3'- bzw. 5'-Überhang (sticky end) oder keinen Überhang (blunt end) besitzen können. Für eine Klonierung wurden Enzyme verwendet, die innerhalb ihrer Erkennungssequenz mit Überhang schnitten. Das ermöglicht eine Hybridisierung für die Ligation.

### 9.9. Transformation

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmiden müssen die Bakterien zunächst die Kompetenz erhalten Plasmide aufnehmen zu können. Dafür wurde eine Vorkultur von *E. coli* in LB Medium (5 ml) über Nacht bei 37 °C angezogen, mit dieser 500 ml LB Medium angeimpft und weiter bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,5-0,6$  wurden die Zellen bei 4 °C und 5.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgekühlter (4 °C) 100 mM Magnesiumchlorid-Lösung (100 ml) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20-30 min auf Eis wurden die Zellen erneut bei 4 °C und 4.000 x g für 10 min abzentrifugiert und in 100 mM Calciumchlorid-Lösung mit 15 % Glycerol auf 4 °C vorgekühlt resuspendiert. Die Suspension wurde zu 150 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kompetente Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

Bei Bedarf wurde die benötigte Anzahl an Aliquots für 15 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von ca. 1 ng Plasmid-DNA bzw. 2-5 µl Ligationsansatz weitere 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec wurde die Transformation abgeschlossen. Nach einer Regenerationsphase von 30-60 min bei 37 °C und 220 rpm in 250 ml SOC-Medium wurden 100-150 µl Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit einem Antibiotikum ausplattiert, welches der auf dem Plasmid vermittelten Resistenz entspricht, und bei 37 °C für 16 h inkubiert.

Kompetente *S. cerevisiae*-Zellen wurden mittels S. c. EasyComp Transformation Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben hergestellt und transformiert.

## 9.10. Heterologe Expression

Zur heterologen Expression der pflanzlichen Enzyme wurden *E. coli* oder Hefezellen mit der jeweiligen cDNA im Expressionsvektor transformiert und die transformierten Zellen unter geeigneten Bedingungen weiter kultiviert. Die erfolgreiche Expression wurde durch Biotransformation geeigneter Substrate oder durch Aufschluss der Zellen und anschließender *in vitro* Messung von Enzymaktivitäten überprüft.

### 9.10.1. Expression in *E. coli*

Die Vorkultur (5 ml LB Medium mit Ampicillin) wurde mit frisch transformierten Bakterien oder *E. coli* aus einem Glycerolstock beimpft, für 16 h bei 37 °C inkubiert und 3 ml dieser Vorkultur zur Inokulation von 50 ml LB Medium (Ampicillin) verwendet. Diese Kultur wurde bei 37 °C weiter kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,4 bzw. 0,5 erreicht war. Die Expression mittels Gateway-System wurde bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,4 mit Arabinose (Endkonzentration 0,2 %), andere Expressionssysteme bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit IPTG (1 mM) induziert. Die Zellen wurden vor Sammlung durch Zentrifugation (4000 x g für 10 min) für weitere 4 h bei 37 °C propagiert. Das feuchte Zell-Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Nach Bedarf wurden Pellets von Zellen, die mit den Expressionsvektoren pET15b, pQE70 oder pETDuet-1 transformiert waren, in Aufschlusspuffer III oder IV (5 ml) auf Eis resuspendiert und dann mit Ultraschall (Sonifier, Cycle 0,6, Amplitude 100 %) auf Eis aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte immer parallel in zwei unterschiedlichen Puffern, die zwei unterschiedliche, für Dioxygenasen übliche Puffersysteme und pH-Werte darstellen (III.2.5.). Diejenigen Zellen, die mit Gateway-Vektoren pDEST14 oder pDEST17 transformiert waren, wurden nach Herstellerangaben durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff bzw. im Wasserbad bei 42 °C mit dem Aufschlusspuffer GW aufgeschlossen.

Nach Aufschluss wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation bei 4 °C und 30.000 x g für 10 min abgetrennt und der Überstand für Enzymtests verwendet.

### 9.10.2. Expression in *S. cerevisiae*

Hefe-Transformanten mit den Vektoren pYES2, pYES2.1 und pYES-DEST52 wurden mit dem *S. c.* EasyComp Transformation Kit hergestellt, auf SC-U Festmedium zur Selektion vereinzelt und 3 Tage bei 30 °C angezogen. Etwa 10 dieser Kolonien wurden in SC-U Flüssigmedium (50 ml) überführt und über 16 h bei 30 °C angezogen. Die OD<sub>600</sub> dieser Vorkultur wurde bestimmt und zur Inokulation der Hauptkultur (250 ml YPGE-Medium) bis auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verwendet. Die Hauptkultur wurde für ca. 5-6 h bei 30 °C inkubiert und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,2 durch Zugabe einer wässrigen 20 %igen Galaktose-Lösung zur Endkonzentration von 2 % induziert. Nach weiterer Inkubation über 15 h bei 30 °C wurden die Hefezellen für 5 min bei 4.000 x g abzentrifugiert.

Die Hefezellen wurden anschließend in 27 ml Aufschlusspuffer I oder II (III.2.5.) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4.000 x g für 5 min wurde das Pellet in 2,5 ml vorgekühltem, gleichem Puffer resuspendiert. Es wurden 7,5 g Glasperlen hinzugegeben und die Zellen durch kräftiges vertikales Schütteln aufgeschlossen. Hierzu wurde die Suspension für 20 min alle 30 sec abwechselnd geschüttelt und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden weitere 5 ml des vorgekühlten Aufschlusspuffers zugegeben und mit der Suspension vermischt. Durch Abzentrifugieren bei 30.000 x g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand geklärt und der Rohextrakt auf Enzymaktivität überprüft.

Größere Mengen an Expressionskulturen wurden auf gleiche Weise mit angepassten Puffervolumina sowohl bei Bakterien- als auch bei Hefeexpressionen durchgeführt. Zur Lagerung der Rohextrakte wurden die Lösungen mit 10 % Glycerol versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 9.11. Isolierung der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde nach Dellaporta et al. (1983) aus 1-3 g Pflanzenmaterial isoliert. Das pflanzliche Gewebe wurde in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und in 15 ml Extraktionspuffer (III.2.3.) mit 21 µl

Mercaptoethanol homogenisiert. Nach Zugabe von 1 ml 20 %er SDS Lösung wurde die Suspension gut gemischt und bei 65 °C für 10 min unter gelegentlichem Rühren inkubiert. Anschließend wurden 5 ml 5 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben und nach 30 min auf Eis für 20 min bei 25.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden durch Zugabe von 10 ml Isopropanol und Lagerung bei -20 °C für 40 min die Nucleinsäuren gefällt und durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4 °C für 20 min gesammelt. Das Pellet wurde in 700 µl 50 x TE-Puffer (III.2.3.) gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 7 µl RNase A-Lösung (2.000 U/ml) wurde die RNA für eine Stunde bei 37 °C verdaut, mit 75 µl 3 M Natriumacetat-Lösung zur Fällung der RNA-Bruchstücke versetzt und für 15 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde vollständig getrocknet und in 200 µl Wasser gelöst. Die Konzentration der gelösten genomischen DNA wurde mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt, zur Nutzung als PCR-Template auf eine Konzentration 25 µg/µl verdünnt und bei 4 °C gelagert.

#### 9.12. Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

*E. coli*-Zellen wurde mit rekombinantem Plasmid transformiert und durch Ausplattieren auf Agar-Medium vereinzelt. Zur Überprüfung des Erfolges der cDNA-Ligation bzw. Umklonierung ist es nötig, das Plasmid wieder aus Bakterien zu isolieren. Dies wurde abgewandelt nach Engebrecht et al. (2001) durchgeführt.

Einzelkolonien auf Agarplatten wurden zur Inokulation von LB Medium (5 ml) mit entsprechendem Antibiotikum verwendet und über 16 h bei 37 °C angezogen. Bakterien aus dieser Kultur (2 ml) wurden durch Zentrifugation bei 13.000 x g für eine Minute geerntet, in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert und mit 200 µl Lysispuffer (III.2.2.) gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 150 µl PA-Lösung (III.2.2.) zugegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 x g und 4 °C wurde die Suspension geklärt und der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit 1 ml 100 % Ethanol, das bei -20 °C vorgekühlt war, gemischt und verblieb 2 min

bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Um Plasmid-Isolationen mit höherem Reinheitsgrad zu erhalten (z. B. für Sequenzierung) wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert.

### 9.13. DNA- und Polypeptid-Sequenzanalyse

Sequenzierungen von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzen wurden durch Datenbankvergleiche über die NCBI Homepage mit dem Blast X-Programm sowie durch direkten Vergleich mit anderen DNA- und Protein-Sequenzen mittels Alignments (ClustalW: <http://align.genome.jp/> MultAlign: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) analysiert.

### 9.14. Glycerindauerkulturen

Transformierte und nicht transformierte Bakterienstämme wurden als Glycerindauerkulturen gelagert. Hierzu wurde eine frische Kultur (1 ml) mit steriler Glycerollösung (1 ml) aus 65 % (v/v) Glycerin in 25 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 0,1 M Magnesiumsulfat gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## 10. Biochemische Methoden

### 10.1. Synthese von $^{14}\text{C}$ markierten Substraten

Die Flavanone [4a,6,8- $^{14}\text{C}$ ]NAR und [4a,6,8- $^{14}\text{C}$ ]ERI wurden mit rekombinanter Chalkonsynthase aus *Pinus sylvestris* und rekombinanter Chalkonisomerase aus *Petunia hybrida*, abgewandelt nach Britsch et al. (1981) bzw. Britsch und Grisebach (1985), synthetisiert. Dafür wurden 1,5 nmol [2- $^{14}\text{C}$ ]Malonyl-CoA mit einer Radioaktivität von 90.000

dpm und 1 nmol 4-Cumaroyl-CoA bzw. 1 nmol Kaffeoyl-CoA zusammen mit 10 µl Chalkonisomerase (ca. 7.000 µg/ml) und 20 µl Chalkonsynthase (ca. 2000 µg/ml) in 120 µl 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Produkte wurden je zweimal mit 200 µl Ethylacetat extrahiert. Über Co-Chromatographie mit authentischen Standards wurden die Identitäten der Substanzen überprüft und zur Konzentrationsbestimmung die Radioaktivität mittels Szintillationszähler bestimmt.

Markiertes NAR bzw. ERI wurde mit rekombinanter Flavanon 3β-Hydroxylase aus *Anethum graveolens* nach Gebhardt et al. (2005) zu [4a,6,8-<sup>14</sup>C]DHK bzw. [4a,6,8-<sup>14</sup>C]DHQ umgesetzt. Auch hier wurden die Produkte zweimal mit 200 µl Ethylacetat extrahiert und über Co-Chromatographie mit authentischen Standards identifiziert.

## 10.2. Synthese von LPg und LCy

Für die Synthese von Leucoanthocyanidinen wurden 5-10 mg des entsprechenden Dihydroflavonols (hier DHK bzw. DHQ) mit 2,5-5 mg Natriumborhydrid gemischt und in 1 ml Ethanol gelöst. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über 2 h wurden 5 ml 0,1 % Essigsäure zugegeben und 4 h bei 40 °C inkubiert. Bis zum Gebrauch wurden die Leucoanthocyanidine bei -80 °C gelagert.

## 10.3. Extraktion löslicher Enzyme

Das Pflanzengewebe (200 mg) wurde nach Britsch und Grisebach (1986) mit 100 mg Seesand, 200 mg Puffer-äquilibriertem Dowex 1 x 2 und 1 ml Puffer (s.u.) mit 2 µl Mercaptoethanol und 10 mg Natriumascorbat im Mörser homogenisiert. Nach zweifacher Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 x g für 10 min wurde der Überstand über PD 10 Säulen (GE Healthcare, München) entsalzt. Der Pflanzenrohextrakt wurde direkt zum Enzymtest eingesetzt oder mit 10 % Glycerol versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Aufarbeitung und Enzymtests zur allgemeinen Aktivitätskontrolle erfolgte zunächst in Tris-HCl-Puffer pH 7,5. Zur Messung von 2-ODDn wurde auch Kaliumphosphat- oder HEPES-Puffer mit verschiedenen pH-Werten verwendet.

## 10.4. Enzymtest

### 10.4.1. Standardenzymtests

Die Substrate wurden aus Stammlösungen in Ethylacetat (radioaktiv markierte Substrate) oder Methanol (1 mg/ml) aliquotiert, im Vakuum zur Trockne eingengt und im Puffer gelöst. Die Tests wurden nach Britsch et al., 1981, Britsch, 1990 bzw. Almeida et al., 2007 mit Pflanzenrohextrakt oder Proteinextrakt aus rekombinanten Hefen- und Bakterien bei 30 °C für 30 min durchgeführt.

*Untersuchungen auf Chalconsynthase-Aktivität enthielten:*

5 µl	[2- <sup>14</sup> C]Malonyl-CoA (90.000 dpm; 1,5 nmol)
5 µl	4-Cumaroyl-CoA (0,2 mM)
90 µl	0,1 M Tris-HCl pH 7,5
100 µl	Enzymrohextrakt

*Untersuchungen auf 2-ODD-Aktivität enthielten (300 µl):*

20 µl	2-Oxoglutarat (2 mM)
20 µl	Ammoniumeisensulfat (1 mM)
20 µl	Natriumascorbat (60 mM)
140 µl	0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bzw. 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0 bzw. 7,5
100 µl	Proteinrohextrakt (bzw. 50 µg His-Tag gereinigtes rekombinantes Protein)

Mit 2-ODDn katalysierte Reaktionen wurden mit geöffnetem Reaktionsgefäß im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Die Inkubation wurde durch Extraktion mit zweimal je 200 µl Ethylacetat beendet. Das Produktmuster wurde durch HPLC bzw. durch DC-Vergleich mit authentischen Standards und Bioimaging (Fuji Photo Film, Tokyo/Japan) oder unter UV-Licht analysiert. Quantitative Tests wurden mit Hilfe eines externen Standards ausgewertet.

Substrate für diese Tests waren 0,027 nmol <sup>14</sup>C-markiertes NAR, ERI, DHK oder DHQ von 5000 dpm. Im Test der rekombinanten 2-ODDn aus *E. arvense* wurden Enzymextrakte mit einer Proteinkonzentration von etwa 2,2-2,5 mg/ml eingesetzt.

Zur Auswertung mit HPLC wurde der Rohextrakt aus *E. arvense* in semipräparativen Inkubationen (tot. Volumen 30 ml) eingesetzt, die 36 nmol NAR, je 2 ml der Kofaktoren-Lösungen und 10 ml Enzymrohextrakt in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 enthielten.

Enzymtests mit rekombinanter ANS aus *P. crispum* (ca. 3,5 mg Protein/ml) wurden mit [<sup>14</sup>C]DHK in zweistufiger Umsetzung durchgeführt. DHK wurde zunächst mit einer rekombinanten DFR aus *Callistephus chinensis* (ca. 5,0 mg Protein/ml) zu LPg umgesetzt, bevor im zweiten Schritt die ANS und deren Kofaktoren zugegeben wurden. Aufgrund des nicht quantitativen Umsatzes des DHK zu LPg mittels DFR konnte gleichzeitig die Nebenaktivität der ANS, der Umsatz von Dihydroflavonolen zu Flavonolen, überprüft werden.

#### 2-Stufen-Reaktion:

##### 1. Stufe:

10 µl	NADPH (20 mM)
90 µl	0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5
100 µl	DFR Enzymrohextrakt (in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5)

##### 2. Stufe: 30 min nach Reaktionsstart wurden folgende Bestandteile zugegeben

20 µl	2-Oxoglutarat (2 mM)
20 µl	Ammoniumeisensulfat (1 mM)
20 µl	Natriumascorbat (60 mM)
140 µl	Proteinrohextrakt (in 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bzw. 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0)

Rohextrakt aus *E. arvense* (ca. 0,8-1 mg Protein/ml) wurde mit radioaktiv markiertem NAR (0,027 nmol; 5000 dpm) als Substrat auf Monooxygenasen-Aktivität geprüft. Diese Inkubation enthielt im Gesamtvolumen von 200 µl:

10 µl	NADPH (20 mM)
90 µl	0,1 M KPi-Puffer pH 6,0
100 µl	Proteinrohextrakt



#### 10.4.2. Hemmtests

Inkubationen mit *E. arvense* und markiertem NAR wurden auch in Gegenwart der Hemmstoffe für 2-ODDn Prohexadion (2.8 mM), EDTA (5 mM), 2,4-Pyridindicarboxylat (5 mM), Diethylpyrocarbonat (DEPC, 5 mM), Diethyldithiocarbamat (1 mM) und Pyruvat (25 mM) bzw. der P450 Monooxygenasen-Hemmstoffe Tetcyclacis (50 µM), Ketoconazol (50 µM), Ancyimidol (50 µM), Cytochrom c (2.5 µM) und S-Adenosyl-L-Homocystein (800 µM) durchgeführt (Halbwirth et al., 2006; Knott, 2004; Britsch and Grisebach, 1986; Federolf et al., 2007). Zusätzlich wurde die 2-ODD-Aktivität bei Fehlen einzelner oder mehrerer Kofaktoren, 2-Oxoglutarat, Eisen(II)ionen und Ascorbat, überprüft.

#### 10.5. Biotransformation

Parallel zu *in vitro* Tests wurden die transformierten Bakterien oder Hefezellen mit NAR oder DHK (für *E. arvense* 2-ODDn) bzw. NAR, DHK, DHQ, LPg oder LCy (für *P. crispum* ANS) als Substrat zur Biotransformation versetzt. Dazu wurden 20 mg Substrat in 1 ml DMSO gelöst und jeweils 50 ml-Kulturen der induzierten Zellen zugesetzt (Witte et al., 2008). Bei Substratzugabe sowie nach 5 h, 17 h und 24 h wurden Proben (1 ml) gezogen, zweimal mit je 1 ml Ethylacetat ausgeschüttelt und der Extrakt mittels DC und HPLC analysiert.

#### 10.6. Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte nach 10 min Reaktionszeit bei einer Wellenlänge von 595 nm am Photometer. Die Konzentration konnte mit Hilfe einer Eichgeraden abgelesen werden, die mit Rinderserumalbumin (Fraktion V) aufgenommen war.

### 10.7. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Das Trenngel (III.5.4.) wurde zwischen zwei Glasplatten mit Abstandhalter gegossen, nach Polymerisation das Sammelgel (III.5.4) darüber geschichtet und sofort ein Kamm für die Proben-Taschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden ein oder zwei Gele in eine Miniprotean-II Apparatur (Bio-Rad, München) eingesetzt, die mit 1 x Elektrodenpuffer gefüllt wurde.

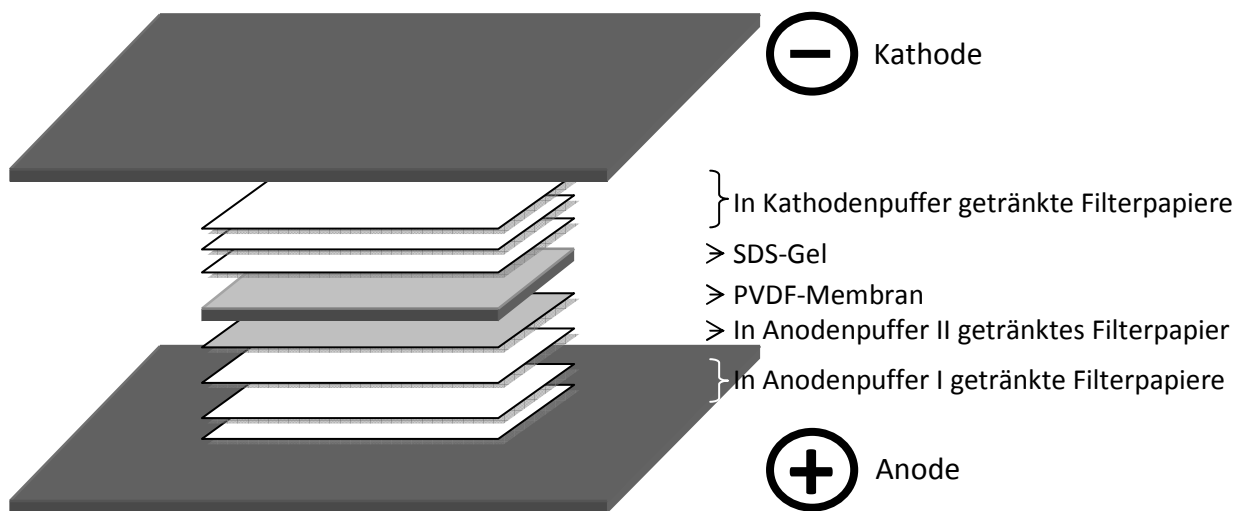
Zur Elektrophorese wurden Proben von 10 µg Protein in maximal 15 µl aufgetragen. Bei geringerer Konzentration wurde das Protein mit 24 % Trichloressigsäure 1:1 für 30 min auf Eis gefällt, durch Zentrifugation (4 °C, 13.000 x g für 10 min) gesammelt und das Pellet zweimal mit je 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 5 µl Wasser aufgenommen. Alle Proben wurden nach Zugabe von 5 µl SDS-Probenpuffer und 5 µl Dithiothreitol (16 mg/ml) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch das SDS wurden die Eigenladungen der Proteine maskiert; alle Proteine lagen so in negativ geladenen Mizellen unterschiedlicher Größe je nach molekularer Masse vor.

Die Proben und ein Proteinmarker (SDS 7 Molekular Weight Marker; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim oder PageRuler Prestained ProteinLadder; Fermentas, St. Leon-Rot) wurden in die Probentaschen gefüllt und für etwa 1 h bei konstant 180 V nach Größe aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden im SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung eingefärbt. Durch wiederholtes Waschen mit Entfärberlösung wurden die Gele so weit entfärbt, dass die Proteine als klare, scharf abgrenzbare Banden zu erkennen waren.

### 10.8. Western-Blot

Bei einem Western-Blot werden über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine irreversibel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen (Towbin et al., 1979) und mit Hilfe von Antikörpern und einer anschließenden Färbereaktion hoch spezifisch nachgewiesen. Zum Vergleich müssen hier vorgefärbte Protein-Marker verwendet werden (PageRuler Prestained ProteinLadder; Fermentas, St. Leon-Rot), da die Referenzproteine nicht mit den verwendeten Antikörpern reagieren.

Für den Blot wurden zunächst sechs Blätter Filterpapier und eine PVDF-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) auf die Größe des SDS-PAGE-Gels zurechtgeschnitten (6 x 9 cm). Zwei Blätter Filterpapier wurden im Anodenpuffer I, ein Blatt im Anodenpuffer II und drei Blätter im Kathodenpuffer (III.2.7.) getränkt. Die Membran wurde 5 min in Methanol eingelegt, mit Wasser abgewaschen und anschließend im Anodenpuffer II äquilibriert. Der Blot wurde in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Schleicher und Schuell, Dassel) bei konstant 100 V über 30 min ausgeführt (Abbildung 11).



**Abbildung 11**  
Western-Blot Aufbau

Die Effizienz der Proteinübertragung konnte an Hand der gefärbten Markerbande oder durch Anfärben der eventuell auf dem SDS-Gel verbliebenden Proteinbanden überprüft werden.

Die Immundetektion erfolgte mit verschiedenen Antikörpern gemäß Angaben der Antikörperhersteller. Die Expression der putativen FLS aus Ackerschachtelhalm wurde mit einem Anti-V5-Epitop-Antikörper (Anti-V5-AP Antibody, Invitrogen, Karlsruhe) kontrolliert, während für den Expressionsnachweis der ANS aus Petersilie ein monoklonaler Anti-Polyhistidin-Antikörper (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet wurde. Der V5-Antikörper war bereits mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, wohingegen die mit Anti-Polyhistidin-Antikörper inkubierten Membranen mehrfach gewaschen werden mussten, um überschüssige primäre Antikörper abzuwaschen, bevor mit einem sekundären, murinen

Antiserum mit gebundener alkalischer Phosphatase gegen die Fc-Bereiche des Anti-Polyhistidin-Antikörpers inkubiert werden konnte.

Vor der Färbereaktion wurden die mit Antikörpern behandelten Membranen sorgfältig gewaschen und mit Farbreaktionspuffer äquilibriert (III.2.7.). Zuletzt wurden 15 ml Farbreaktionspuffer mit 100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, 50 mg/ml in Dimethylformamid) und 300 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 75 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) versetzt, zu den Membranen gegeben und leicht geschwenkt. Nach maximal 5 min wurde die Färbereaktion durch Abgießen des Färbereagenzes und Waschen mit Wasser gestoppt.

## 10.9. Proteinreinigung

### 10.9.1. Affinitätsreinigung an $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose

Verschiedene Vektoren kodieren ein Histidin-Oligomer (His-Tag), meist bestehend aus 6 Histidinen, im Leseraster nach oder vor dem multiplen Klonierungsabschnitt. Wenn die His-Tag-Sequenz am 3'-Ende der kodierenden Sequenz liegt, wird der Tag C-terminal angehängt. Beim Klonieren ist darauf zu achten, dass die Sequenz des Inserts für das zu exprimierende Protein dem Leseraster der Sequenz des Tags entspricht. Bei C-terminalen Tags ist außerdem zu beachten, dass das Stopp-Codon der cDNA entfallen muss, um die Translation des Proteins nicht vorzeitig zu beenden.

Der His-Tag ermöglicht die Metallchelate-Chromatographie. Zu diesem Zweck werden rekombinante, induzierte Bakterien oder Hefezellen in Bindepuffer, der zusätzlich 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 0,2 % (w/v) Natriumdesoxycholat enthielt (III.9.10.1), aufgeschlossen. Bei Klonierungen und Expressionen mit dem Gateway-System wurden die Bakterien mit dem Aufschlusspuffer GW (III.2.8.) aufgeschlossen (III.9.10.1). Nach Aufschluss wurde der Proteinrohextrakt für 30 min bei 4 °C mit dem Nickel-beladenen Säulenmaterial ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose, Bio-Rad, München) inkubiert und die Suspension in eine PD10-Leersäule (GE Healthcare, München) gegeben. Nach Auffangen des Durchlaufs wurde die Säule mit 20 ml Bindepuffer gewaschen und die Waschfraktion getrennt vom Durchlauf gesammelt. Das gebundene Protein wurde in fünf je 1 ml-Schritten mit Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Von allen sieben Fraktionen wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt und eine Probe mittels SDS-PAGE analysiert. 2,5 ml der proteinreichsten Elutionsfraktionen wurden über eine PD10-Säule (GE Healthcare, München) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 oder in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0 umgepuffert und auf Dioxygenasen-Aktivität geprüft.

### 10.9.2. Enzymreinigung

#### *Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung*

Das Protein aus *E. arvense*-Pflanzenrohextrakt in Kaliumphosphat-Puffer pH 6 wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung fraktioniert (30 %, 50 % bzw. 80 %-Sättigung) (Rohde et al., 2008). Die Fraktionen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g für 20 min gesammelt und in Puffer A (III.2.8.) bei 4 °C aufgenommen. Katalytisch aktive Fraktionen wurden vereinigt.

#### *Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)*

Die HIC nutzt die unterschiedliche Bindung von Proteinen an einer hydrophoben Matrix in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Reinigung erfolgte durchgehend bei 4 °C.

Das in Puffer A gelöste Protein aus der Ammoniumsulfatfällung (30-80 %) wurde auf die Fractogel EMD Propyl 650 (S)-Säule (Merck, Darmstadt) mit einem Bettvolumen von 36 ml (Superperformance 16) gegeben und mit der FPLC-Anlage aufgetrennt. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A (1 ml/min) äquilibriert und mit der Hälfte der Proteinlösung (25 ml) beladen. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Proteins wurde ein linearer Gradient von 100 % Puffer A auf 100 % Puffer B (1 ml/min) in 30 min angelegt, Fraktionen (1 ml) gesammelt und die Proteinelution mit einem UV-Detektor (280 nm) überwacht. Zunächst wurde jede fünfte Fraktion und nach Einsetzen hoher Proteinelution jede zweite Fraktion auf enzymatische Aktivität (III.10.4.1.) geprüft. Mit den zweiten 25 ml der Proteinlösung der Ammoniumsulfatfällung wurde ebenso verfahren und die Fraktionen beider Läufe, die eine Enzymaktivität aufwiesen, vereinigt.

*Größenausschluss-Chromatographie (Size exclusion chromatography, SEC)*

Zur Konzentrierung wurde das Enzym aus der HIC mit 80 % Ammoniumsulfat gefällt, in 1 ml Puffer B (III.2.8.) aufgenommen und auf die in Puffer B äquilibrierte SEC-Säule (Fractogel EMD BioSEC; Merck, Darmstadt) gegeben. Die Superperformance 16-Säule (600 x 16 mm, Gelbettvolumen 113,5 ml) wurde mit Puffer B (1 ml/min) über 60 min eluiert und die Fraktionen (1 ml) mit radioaktiv markiertem NAR als Substrat auf ihre Aktivität untersucht.

*Ionenaustausch-Chromatographie (Ion-exchange chromatography, IEX)*

Da die isoelektrischen Punkte der meisten pflanzlichen Proteine zwischen 4 und 6 rangieren, liegen diese in schwach basischen Puffern als Anionen vor und können an die funktionellen Gruppen von Anionenaustauschern binden. Durch langsame Steigerung der Salzkonzentration im Laufpuffer werden die Proteine je nach Ladung vom Säulenmaterial eluiert, d. h. ein stärker geladenes Protein wird später von der Säule eluiert, weil eine größere Konzentration von Ionen nötig ist, um das Protein von der Säule zu verdrängen.

Zur Trennung wurde Fractogel DEAE 650 (S) (Merck, Darmstadt) in einer Superperformance SF (156 x 26 mm, Bettvolumen 67,5 ml) verwendet. Die basische Matrix besitzt Diethylaminoethyl-Gruppen (pK-Wert > 11). Nach Spülen der Säule mit Puffer B wurde die Säule mit den von der SEC-Säule eluierten Enzymfraktionen beladen und mit Puffer B (1 ml/min) gewaschen. Nach Absinken der Absorption zur Basislinie wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten von 100 % Puffer B auf 100 % Puffer C (III.2.8.) bei einer Flussrate von 1 ml/min über 45 min eluiert. Die Fraktionen von je 1 ml wurden auf ihre Enzymaktivität überprüft.

*Affinitäts-Chromatographie (2-Oxoglutarat)*

Für zumindest eine 2-ODD aus der Flavonoidbiosynthese wurde berichtet, dass 2-Oxoglutarat von den Kofaktoren zuerst bindet und zur Affinitäts-Chromatographie genutzt werden kann (Anzellotti and Ibrahim, 2000). Deshalb wurde 2-Oxoglutarat nach Herstelleranweisung an Epoxy-aktivierte Sepharose 6 B (GE-Healthcare, Freiburg) gekoppelt und in eine Säule (1 ml) gepackt. Die Säule wurde mit Puffer B (III.2.8.) äquilibriert, dann mit der FHT aus Petersilie zur Methoden-Validierung beladen und wiederum mit Puffer B (1 ml/min) gespült bis die Absorption wieder auf die Basislinie abgesunken war. Die Elution des Enzyms erfolgte mit Puffer D (III.2.8.) gefolgt von Puffer E (III.2.8.) über jeweils 15 min bei

einer Flussrate von 1 ml/min. Die Fraktionen von je 1 ml wurden auf ihre Enzymaktivität überprüft.

#### *Affinitäts-Metallchelate-Chromatographie (zweiwertige Kationen)*

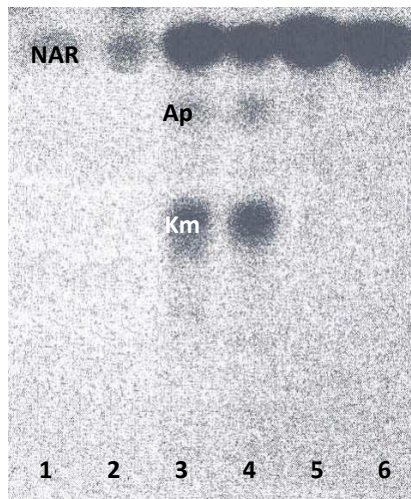
Die Abhängigkeit der 2-ODDn von Eisen(II)ionen impliziert die Möglichkeit zur Affinitätschromatographie an zweiwertigen Kationen, wie z. B. schon mit  $\text{Cu}^{2+}$  (Britsch und Grisebach, 1986) untersucht wurde. Entsprechend wurden auf der Basis von Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) (Profinity IMAC Ni-charged resin, BioRad, München) auch Affinitäts-Matrices mit Kupfer(II) oder Cobalt(II) eingesetzt. Dazu wurde NTA-Agarose mit 0,05 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,5 M EDTA und 0,3 M NaCl zur Entfernung von  $\text{Ni}^{2+}$  eluiert, anschließend mehrfach mit Ethanol und schließlich mit Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Beladung des Säulenmaterials mit  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  wie vom Hersteller empfohlen. Die Affinitäts-Chromatographie von nativen 2-ODDn wurde analog zur Reinigung von His-Tag markierten Enzymen an Ni-NTA-Agarose (III.10.9.1) durchgeführt. Jedoch wurde statt 5x 1 ml Elutionspuffer (III.2.8.) hier 8x 1 ml Puffer, der je nach Matrix  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  enthielt, zur vollständigen Elution des Enzyms benutzt. Nach der Aufreinigung wurden die Protein-reichsten Fraktionen mittels PD10-Säulen zur Trennung von inhibierenden, zweiwertigen Kationen umgepuffert.

## IV. Ergebnisse – *E. arvense*

### 1. Enzyme aus *E. arvense*

#### 1.1. Enzymaktivität

Rohextrakte von sterilen *E. arvense* Sprossen wurden in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 oder HEPES-Puffer pH 7,5 hergestellt und mit  $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA auf die Aktivität von CHS bzw. mit  $[4\alpha,6,8-^{14}\text{C}]$ NAR und den entsprechenden Kofaktoren auf Dioxygenase- oder Monooxygenase-Aktivität getestet (III.10.4.1).



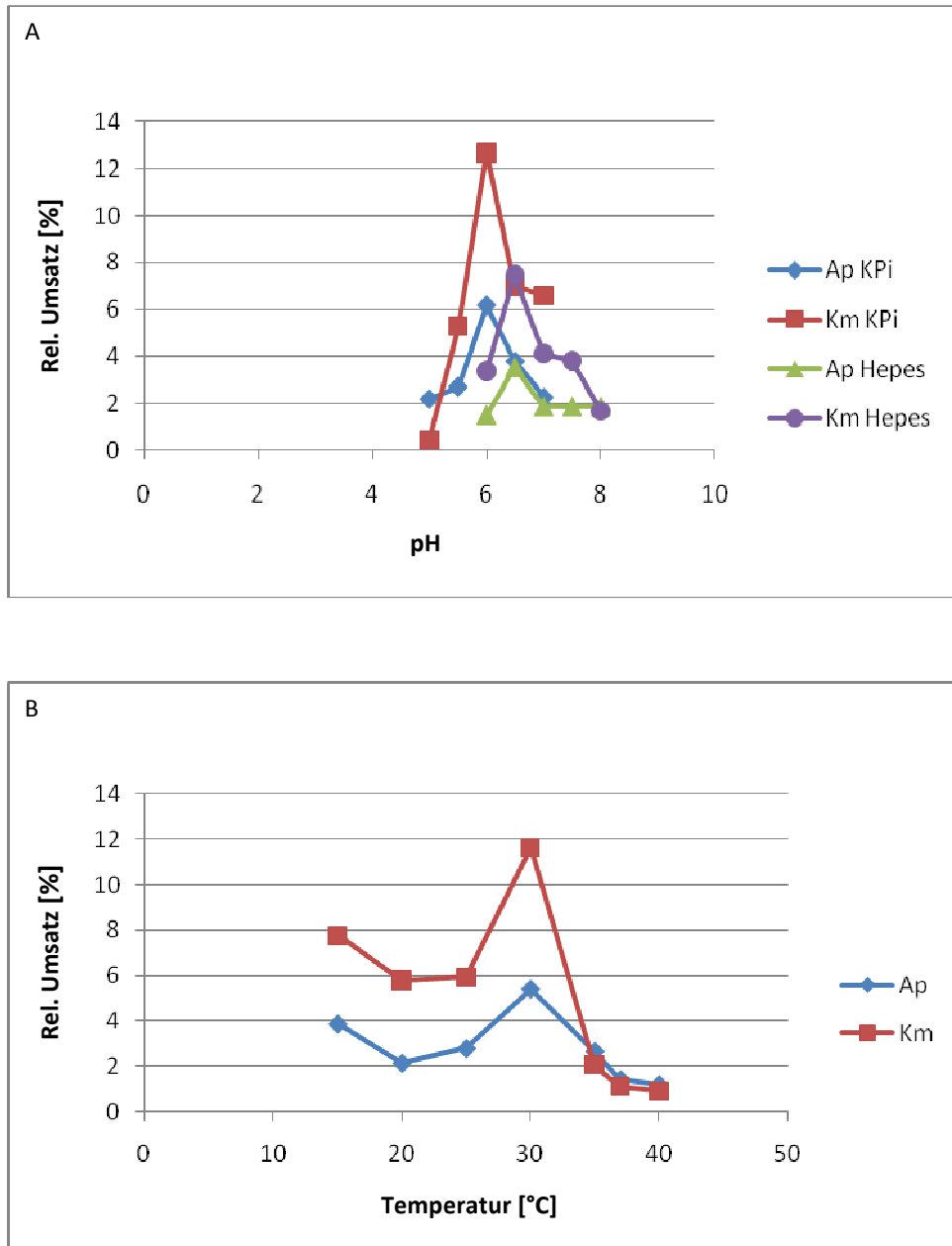
**Abbildung 1**

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität im Pflanzenrohextrakt aus *E. arvense*.  
Getestet wurde auf CHS- (Spur 1,2), 2-ODD- (Spur 3,4) oder P 450 Monooxygenasen-Aktivität (Spur 5,6). Als Substrate wurde 4-Cumaroyl-CoA gemeinsam mit  $[^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA (Spur 1,2) bzw.  $[^{14}\text{C}]$ NAR (Spur 3-6) eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat gestoppt, die Produkte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und mittels Bioimaging detektiert.

Die Bildung von markiertem NAR in Spur 1 und 2 (Abbildung 12) zeigte die CHS-Aktivität im Extrakt; der Nachweis von markiertem Ap bzw. Km ist ein Indiz für FLS- und FNS-Aktivität, wohingegen der Test auf Cytochrom P 450 Monooxygenase-Aktivität negativ ausfiel. Die Produkte der 2-ODD-Inkubationen wurden durch Co-Chromatographie mit authentischem Km und Ap identifiziert. Zur weiteren Charakterisierung dieser Umsetzung wurden verschiedene Parameter detailliert untersucht. Die Bestimmung des pH-Optimums wurde in Testreihen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit pH-Werten von pH 5,0 bis pH 7,0 und mit 0,1 M HEPES-Puffer von pH 6,0 bis pH 8,0 durchgeführt (Abbildung 13A). Dabei wurde ein Umsatzoptimum bei pH 6,0 in Kaliumphosphatpuffer festgestellt, das durch eine höhere Pufferkonzentration nochmals verbessert werden konnte. Für weitere Reaktionen wurden im Folgenden 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 verwendet. Das Temperaturoptimum



wurde bei 30 °C bestimmt (Abbildung 13B). Da die Produktbildung bis zu einer Inkubationszeit von 60 min anstieg (Abbildung 13C), wurde die Standardinkubationsdauer auf 30 min begrenzt. Für die Enzymtests wurden 100 µl des Rohextrakts (ca. 80 µg Gesamtprotein) bei einem Gesamtvolumen von 300 µl eingesetzt. Höhere Extraktkonzentrationen bewirkten keine weitere Umsatzsteigerung sondern wirkten sich hemmend auf den Umsatz aus.



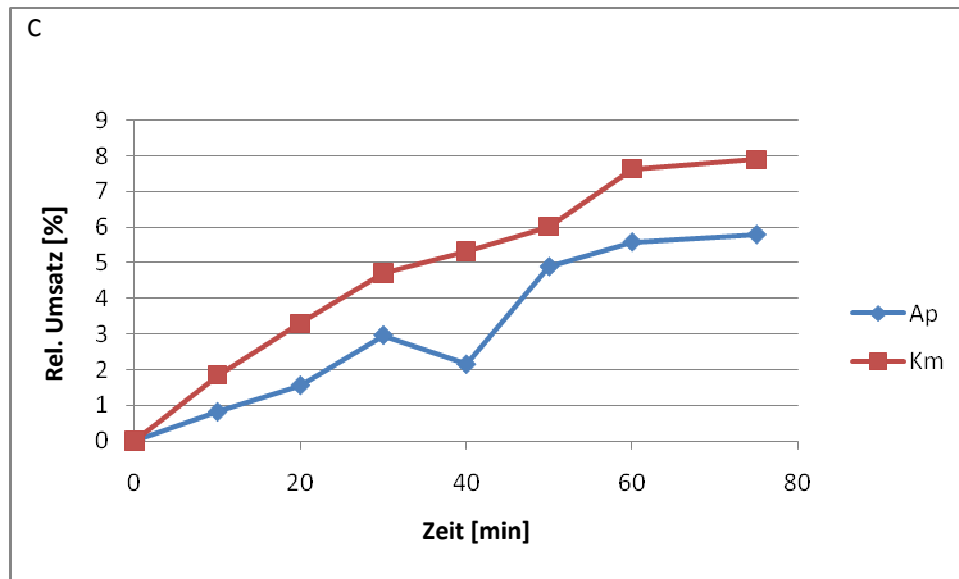


Abbildung 13

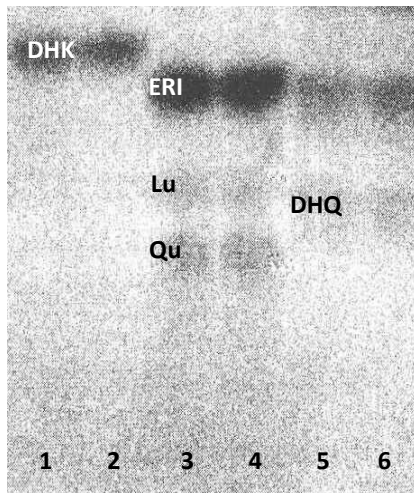
Graphische Darstellung der 2-ODD-Aktivität mit NAR bei unterschiedlichen pH-Werten (A), Temperaturen (B) und in einer Zeitreihe (C).

Die Enzymaktivitäten wurden mit entsalztem Pflanzenrohextrakt aus Ackerschachtelhalm unter Standardbedingungen (30 °C für 30 min, 100 µl Rohextrakt, 133 µM 2-Oxoglutarat, 66 µM Fe(II), 4 mM Ascorbat) in 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 in einem Totalvolumen von 300 µl bestimmt.

Bei der Auswertung von Abbildung 13 ist zu beachten, dass das Substrat (markiertes NAR) nicht in Sättigung vorlag.

## 1.2. Substratspezifitätstests

Unter den gewählten Bedingungen setzte der Rohextrakt etwa 4,2 % des NAR zu Ap und 5 % zu Km um. Diese Enzymaktivität konnte auch mit dem Flavanon [4a,6,8-<sup>14</sup>C]ERI bestätigt werden (Abbildung 14), welches zu dem Flavonol Qu und dem entsprechenden Flavon Lu umgesetzt wurde, die durch Co-Chromatographie verifiziert wurden. Die Umsätze bezogen auf das Ausgangssubstrat ERI zu Lu (7,2 %) und Qu (7,8 %) wiesen dem Enzymextrakt tendenziell eine höhere Substrataffinität zu zweifach hydroxylierten Flavonoiden zu.

**Abbildung 14**

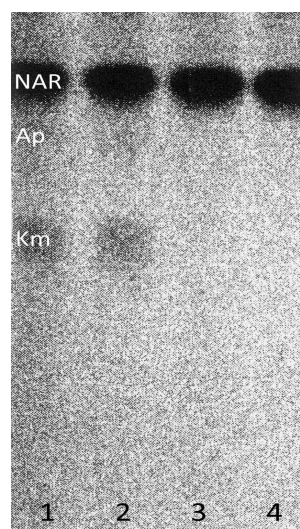
Überprüfung der Substratspezifität der 2-ODDn im *Equisetum*-Pflanzenextrakt.

Als Substrate wurden [ $^{14}\text{C}$ ]DHK (Spur 1,2), [ $^{14}\text{C}$ ]ERI (Spur 3,4) und [ $^{14}\text{C}$ ]DHQ (Spur 5,6) in Aktivitätstests unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und durch Bioimaging ausgewertet.

Die Reaktion vom Flavanon zum Flavonol verläuft formal über die Bildung von Dihydroflavonolen als Zwischenstufen. Bei dem Einsatz von Dihydroflavonolen als Substrat konnte jedoch weder mit DHK, dem zu NAR korrespondierenden Dihydroflavonol, noch mit zweifach am B-Ring hydroxyliertem DHQ (ERI) ein Umsatz nachgewiesen werden (Abbildung 14). Die oberhalb des DHQ liegenden Spots in Spur 5 + 6 sind nicht umgesetzte Substratreste (ERI) der DHQ-Synthese. Daraus ließ sich zunächst schließen, dass die Zwischenprodukte während der Reaktion nicht freigesetzt werden und auch nicht als Substrat akzeptiert werden.

### 1.3. Hitzedenaturierung

Zum Nachweis einer enzymatischen Aktivität wird üblicherweise eine Kochkontrolle durchgeführt. Nach Erhitzen des Rohextraktes auf 95 °C für 5 min konnte kein Umsatz von NAR zu Ap und Km mehr detektiert werden (Abbildung 15). Dies lässt auf eine Enzym-katalysierte Reaktion schließen.

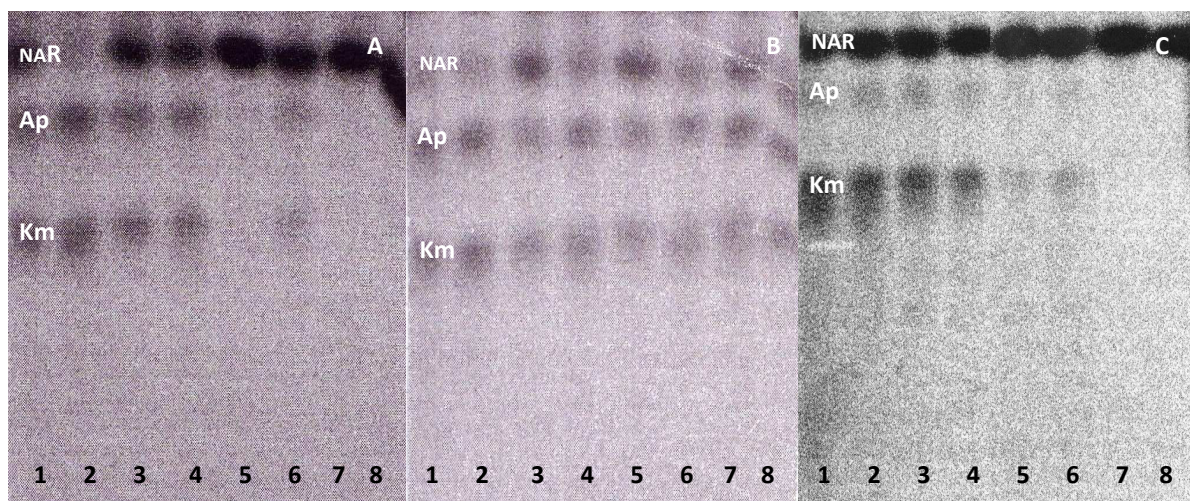
**Abbildung 15**

Überprüfung der Umsatzaktivität im *Equisetum*-Pflanzenextrakt vor (Spur 1,2) und nach Erhitzen auf 95 °C (Spur 3,4).

Als Substrate wurden [ $^{14}\text{C}$ ]NAR in Aktivitätstests unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und durch Bioimaging ausgewertet.

### 1.4. Enzymstabilität

Die enzymatische Aktivität von *E. arvense*-Rohextrakt zur Umsetzung von NAR erwies sich bei Raumtemperatur als sehr instabil und konnte auch bei Lagerung des Rohextraktes auf Eis (4 °C) nur bis maximal 6 h nachgewiesen werden (Abbildung 16A). Eine Lagerung bei -80 °C hatte nur geringe Aktivitätsverluste zur Folge selbst bei längerer Lagerung über mehrere Wochen bis Monate (Abbildung 16B). Jedoch verlor der Extrakt nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen schnell an Aktivität und war bereits nach dem dritten Einfrier-Auftau-Zyklus inaktiv (Abbildung 16C).



**Abbildung 16**

Überprüfung der Stabilität der Enzymaktivität im *Equisetum*-Pflanzenextrakt unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

Als Substrate wurden [<sup>14</sup>C]NAR in Aktivitätstests unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und durch Bioimaging ausgewertet.

**(A) Enzymstabilität bei 4 °C Lagerung:** Spur 1 + 2 Aktivitätstest direkt nach der Aufarbeitung; Spur 3 + 4 Aktivitätstest nach 3 h; Spur 5 + 6 Aktivitätstest nach 6 h; Spur 7 + 8 Aktivitätstest nach 9 h

**(B) Enzymstabilität bei -80 °C Lagerung:** Spur 1 + 2 Aktivitätstest direkt nach der Aufarbeitung; Spur 3 + 4 Aktivitätstest nach 1 Tag, Spur 5 + 6 Aktivitätstest nach 2 Tagen, Spur 7 + 8 Aktivitätstest nach 6 Tagen  
In (A) und (B) wurden pro Test in der jeweiligen 1. Spur 50 µl, 2. Spur 100 µl Proteinrohextrakt eingesetzt

**(C) Enzymstabilität nach mehrmaligen Gefrieren (-80 °C) und Auftauen (bei 4 °C):** Spur 1 + 2 Aktivitätstest direkt nach der Aufarbeitung; Spur 3 + 4 Aktivitätstest nach dem 1. Einfrier-Auftau-Zyklus; Spur 5 + 6 Aktivitätstest nach dem 2. Einfrier-Auftau-Zyklus; Spur 7 + 8 Aktivitätstest nach dem 3. Einfrier-Auftau-Zyklus

In (C) wurden pro Test stets 100 µl Proteinrohextrakt eingesetzt

## 1.5. Produktanalyse

### 1.5.1. DC

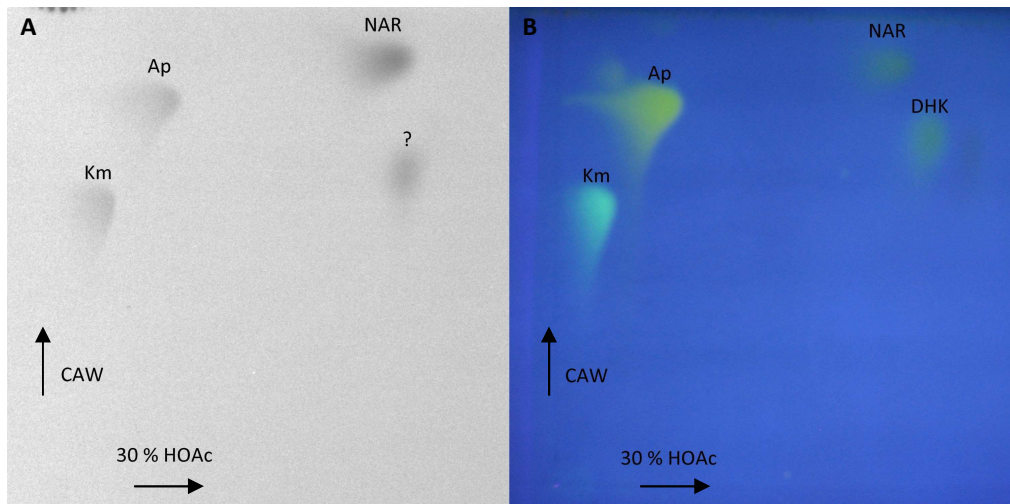
Die Produkte aus dem Umsatz von markiertem NAR wurden durch Cellulose-DC in verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Co-Chromatographie mit authentischen Standards. Hierbei wurden die  $R_f$ -Werte der Produkte im Bioimaging mit denen der authentischen Standards unter UV-Licht verglichen (Tabelle 1). Auf diese Weise wurde die Identität der Produkte in acht verschiedenen Laufmitteln bestätigt. Neben dem Substrat NAR und den Produkten Ap und Km konnte ein weiteres Produkt detektiert werden. Aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens wurde zunächst DHK als weiteres Produkt vermutet. Bei direktem Vergleich der  $R_f$ -Werte wurde dies jedoch widerlegt (Tabelle 1 Vergleich DHK und unbekanntes Produkt).

**Tabelle 1**

$R_f$ -Werte von unmarkierten, authentischen Standards und radioaktiv markierten Produkten aus dem Enzymtest auf Cellulose-Platten mit verschiedenen Laufmitteln

Laufmittel	NAR		Ap		Km		DHK	Unbekan. Produkt
	14C	Unmark.	14C	Unmark.	14C	Unmark.		
CAW	14,00	14,00	11,88	11,88	7,75	7,70	10,00	8,38
30% HOAc	11,38	11,38	3,75	3,70	1,80	1,75	12,38	11,75
15% HOAc	5,75	5,75	0,75	0,75	0,25	0,25	9,50	8,25
Forestal	16,45	16,50	15,00	15,00	11,63	11,70	16,13	15,50
Formic	10,38	10,38	6,25	6,18	2,00	1,95	12,00	10,88
G	15,73	15,70	15,63	15,63	15,50	15,50	15,70	15,50
H	16,38	16,38	16,25	16,23	15,38	15,45	16,75	16,38
I	15,75	15,75	13,75	13,73	10,95	11,00	15,00	14,60

Zudem wurde zweidimensional chromatographiert. Dabei wurde die DC-Platte zunächst mit CAW entwickelt, anschließend um 90 °C gedreht und mit einem der übrigen 7 Fließmitteln (B+C, E-I (III.8.2)) in die zweite Dimension laufen gelassen. Auch bei dieser erweiterten Analyse wurden die Produktidentitäten bestätigt (Abbildung 17).

**Abbildung 17**

Auftrennung von Ethylacetat-Extrakten aus Standard-2ODD-Enzymtests mit *Equisetum*-Pflanzenextrakt mittels 2D-DC.

Als Substrat diente [ $^{14}\text{C}$ ]NAR. Die Inkubation wurden in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 durchgeführt und durch Extraktion mit Ethylacetat beendet. Sowohl die Extrakte als auch die authentischen Standards Ap, DHK, Km und NAR wurden auf Cellulose-DC in CAW (1. Dimension) und 30 % HOAc (2. Dimension) aufgetrennt.

(A) Detektion mittels Bioimaging

(B) UV-Detektion

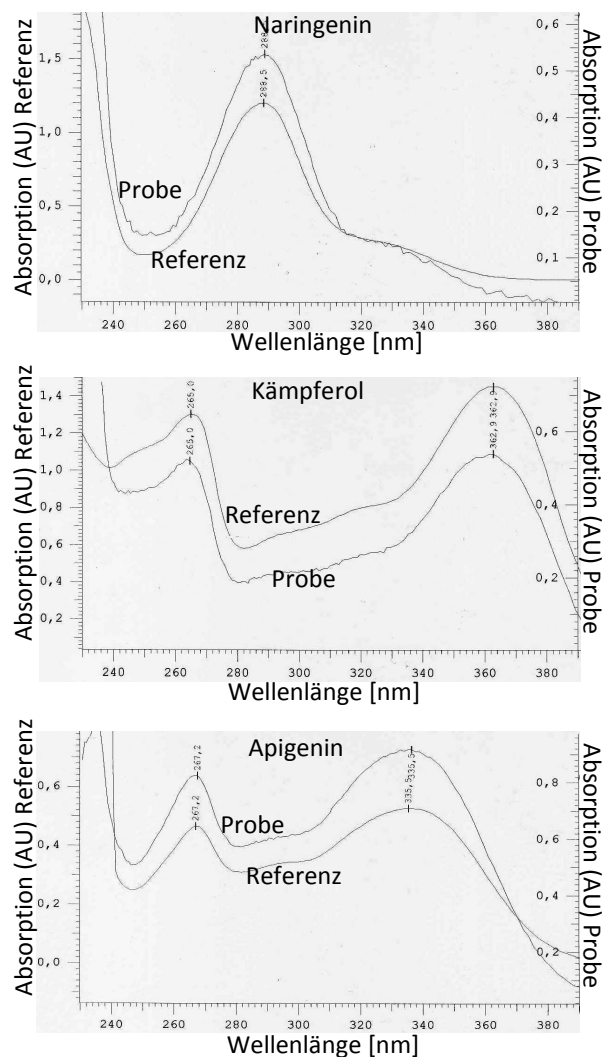
Das Muster der radioaktiven Flavonoide (Abbildung 17A) stimmt mit dem unter UV-Bestrahlung sichtbaren Referenzsubstanzen (Abbildung 17B) überein, die nach Inkubation zur Co-Chromatographie zugefügt worden waren, wobei DHK als zusätzlicher Standard benutzt wurde. Radioaktiv markierte Substanzen sind selbst nicht unter UV-Bestrahlung zu detektieren, da ihre Menge weit unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Ein weiteres, allerdings schwaches Indiz für die Identität der Produkte liefert die Form der Substanzflecke. Die Signale für Ap und Km weisen im Bioimaging die gleiche Ausbreitung und Schweifbildung auf wie die Flecke der UV-Detektion. Dies spricht dafür, dass es sich bei den radioaktiven Produkten und den Referenzen um die gleichen Substanzen handelt, die sich homogen vermischt haben.

### 1.5.2. HPLC

Die aus der DC abgeleiteten Ergebnisse konnten durch Inkubation größerer Mengen von kaltem NAR und HPLC-Auswertung (III.8.3) bestätigt werden. Die Retentionszeiten der Referenzen Ap und Km und der Produkte stimmten sowohl separat gemessen als auch bei Co-Chromatographie (Spiking) überein (Abbildung im Anhang). Spiking vergrößert die Signalintensität, ohne dass Doppelpeaks entstehen, wobei eine zu hohe Konzentration an Referenzsubstanz die Trennsäule überladen und ein Tailing erzeugen würde.

Der verwendete Detektor (III.8.3) zeigt neben der Retentionszeit auch das Spektrum der eluierten Substanzen. Der Vergleich mit Referenzspektren bestätigte die Übereinstimmung von Referenz und Probe (Abbildung 18).



**Abbildung 18**

Spektren von Substrat (NAR) und Produkten (Ap, Km) nach Extraktion aus der 2-ODD-Standard-Inkubation mit *E. arvense* Rohextrakt und Auftrennung durch HPLC.

Die Spektren wurden jeweils mit der Absorption authentischer Referenzen verglichen.

### 1.5.3. UPLC-MS

Die UPLC-MS ermöglicht neben der massenspektrometrischen Identifizierung der Produkte auch eine schärfere Auftrennung durch sehr hohe Trennleistung. Die Analyse mittels UPLC-MS bestätigte die Ergebnisse der DC- und HPLC-Untersuchungen. Die Produkte wurden durch ihre UV-Spektren und MS-Fragmentierung im Vergleich mit den Referenzsubstanzen verifiziert. Als zusätzliche Substanz konnte hier aufgrund der höheren Sensitivität der UPLC-MS-Methode auch das Zwischenprodukt DHK zum ersten Mal detektiert werden (Abbildung im Anhang).

### 1.6. Abhängigkeit von Kofaktoren

Zur weiteren Charakterisierung der Umsetzung von markiertem NAR mit *E. arvense*-Rohextrakt wurde die Abhängigkeit von Kofaktoren getestet (III.10.4.3). Der Umsatz mit entsalztem Rohextrakt und in Gegenwart aller Kofaktoren wurde als 100 % gesetzt und davon ausgehend die relative Produktbildung bei fehlenden Kofaktoren berechnet (Tabelle 2).

**Tabelle 2**

Abhängigkeit der 2ODD-Aktivität von Kofaktoren

Enzym	2-Oxoglutarat (133 µM)	Fe <sup>2+</sup> (66 µM)	Ascorbat (4 mM)	Relativer Umsatz (%)	
				Ap	Km
Rohextrakt	+	+	+	82,3	67,8
	-	-	-	24,8	35,2
Rohextrakt nach Gelfiltration (PD 10)	+	+	+	100	100
	-	-	-	0	0
	-	+	+	0	0
	+	-	+	39,5	21,5
	+	+	-	0	0
	+	-	-	0	0
	-	+	-	0	0
	-	-	+	0	0

+ = zum Test zugegeben; - = nicht im Test enthalten



Das Entsalzen des Rohextraktes steigert offensichtlich die Aktivität, während die Aktivität des unbehandelten Rohextraktes nicht essentiell auf die Zugabe von Kofaktoren angewiesen ist. Nach Entsalzen benötigt das Enzym allerdings zumindest die Zugabe von 2-Oxoglutarat und Ascorbat.

Der Test ohne Kofaktoren wurden mit unmarkiertem NAR wiederholt und über HPLC Analyse ausgewertet. Auch in HPLC-Chromatogrammen konnte kein Umsatz in Abwesenheit von Kofaktoren nachgewiesen werden. Desweiteren wurden Negativkontrollen durchgeführt, für die sowohl das Substrat NAR allein in Puffer inkubiert als auch Enzymextrakt allein mit Kofaktoren in Puffer jedoch ohne Substrat getestet wurde. Die Analyse dieser Tests zeigte keine Produkte. DHK, das im Chromatogramm der Standards eine Retentionszeit von etwa 4,7 min aufwies, konnte im Chromatogramm des Standardenzymtests keinem Peak zugeordnet werden (Abbildung im Anhang). Dies bestätigt die Annahme, dass DHK nur in sehr kleinen Mengen vom Enzym freigesetzt und akzeptiert wird.

### 1.7. Hemmversuche

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von Oxoglutarat und Eisen(II)ionen klassifiziert das Enzym als 2-ODD, für das eine Reihe von Hemmstoffen existiert. Hydroxylierungen und Desaturierungen, wie sie für FLS oder FNS typisch sind, könnten allerdings auch durch membrangebundene P450-Monooxygenasen katalysiert werden. Hemmstoffe für Cytochrom P450 Monooxygenasen hatten kaum Einfluss auf die Enzymaktivität, wohingegen spezifische 2-ODD Inhibitoren eine unterschiedlich ausgeprägte, aber dennoch deutliche

**Tabelle 3**

Relativer Effekt von potentiellen Hemmstoffen auf Enzymreaktionen im *Equisetum*-Extrakt.

Kontrolle		Relative Produktmenge in [%] des Standardumsatzes										
Inhibitoren		Proh	EDTA	2,4PDC	DEPC	DEDC	Pyr	Cyt C	SALH	Keto	Ancy	Tet
Umsatz zu Ap	100	21,2	16,8	79,0	101,2	3,1	72,2	104,6	102,2	102,2	95,7	95,4
Umsatz zu Km	100	4,1	1,0	39,9	98,7	0,0	120,2	98,9	96,2	93,4	107,4	101,0

Hemmung der Reaktion zeigten (Tabelle 3). Lediglich Pyruvat scheint nur einen selektiven Einfluss auf die Bildung von Ap zu besitzen.

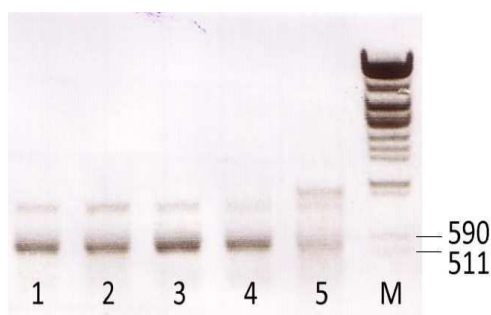
Wie im Falle der Kofaktor-Abhängigkeit (Tabelle 2) wurde auch der Effekt von Inhibitoren durch Umsetzung von radioaktiv markiertem NAR und Auftrennung mittels Cellulose-DC in CAW und anschließendem Bioimaging analysiert. Tests mit Prohexadion wurden mit unmarkierten NAR wiederholt und mittels HPLC-Analytik bestätigt (Abbildung im Anhang).

## 2. Klonierung und Expression einer 2-ODD aus *Equisetum* (*Ea*ODD1)

### 2.1. cDNA-Klonierung

Die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen belegen, dass *E. arvense* 2-ODDn mit FNS I-, FHT- und FLS-Aktivität besitzt. Auf dieser Grundlage sollten die entsprechenden Gene kloniert werden. Das Vorkommen einer FNS I, die bisher nur in der Familie der Apiaceae nachgewiesen wurde (Gebhardt et al., 2005), ist sehr ungewöhnlich und lässt aufgrund der hohen taxonomischen Diversität zwischen Apiaceae und Equisetaceae keine hohe Sequenzidentität der Enzyme erwarten. Aus diesem Grund wurden weitgehend degenerierte Primer für die Klonierung von Dioxygenasegenen auf Grundlage konservierter Bereiche in verschiedenen FLS- und FHT-Sequenzen entwickelt (Martens et al, 2003). Nach Transkription der Gesamt-mRNA aus *E. arvense* in cDNA wurden zunächst verschiedene PCR-Ansätze mit diesen Primern (Dioxy1H, Dioxy2H, Dioxy1R) und dem oligo-dT-Primer unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Innerhalb dieser Versuchsreihen konnte mit den Primern Dioxy1H und Dioxy1R in 40 Zyklen bei 45-56 °C ein Produkt amplifiziert (Abbildung 19) werden, das in den Klonierungsvektor pCR2.1 TOPO TA ligiert wurden.

**Abbildung 19**



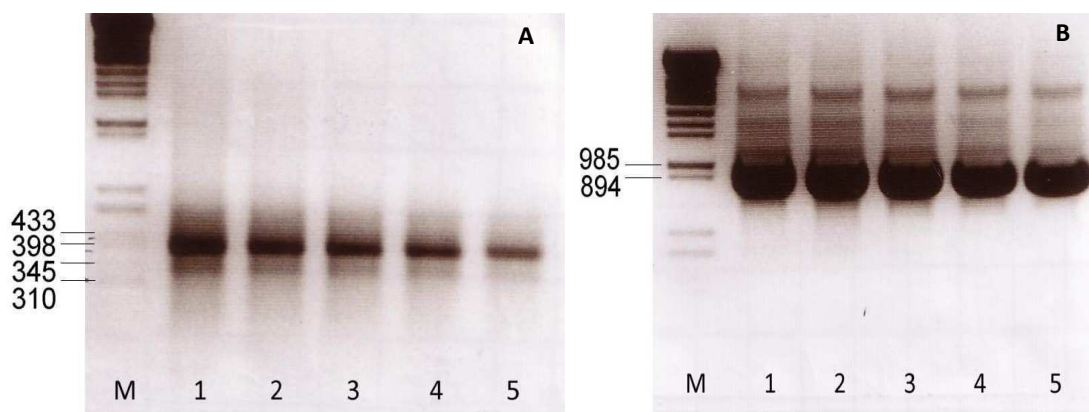
PCR-Amplifizierung des 2-ODD-cDNA-Abschnittes aus *Equisetum* mit Dioxy1H und Dioxy1R als Primer. Die PCR-Produkte mit *Ea* Gesamt-cDNA als Template wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung nachgewiesen. Die Länge des PCR-Produkts 450-500 bp entsprach den Erwartungen.

1 = 45 °C; 2 = 48 °C; 3 = 50,5 °C; 4 = 53 °C; 5 = 56 °C

PCR-Produkt Nr. 3 wurde kloniert.

Nach der Sequenzierung konnte das Amplicon einem Sequenzbereich aus der Mitte von Dioxygenasen zugeordnet werden. Es wies eine Identität von 25-31 % zu verschiedenen FLS-Sequenzen auf. Weiter konnte festgestellt werden, dass die Amplifikation des PCR-Produktes nicht wie erwartet mittels beider Primer (Dioxy1H, Dioxy1R) erfolgt war, sondern der Dioxy1H-Primer auch für die Rückreaktion genutzt worden war. Kontroll-Amplifikationen, in denen nur der Primer Dioxy1H eingesetzt wurde, bestätigten das Ergebnis.

Mit dieser Teilsequenz wurden Primer für das 3'- und das 5'-RACE (3'-RACE: *EaputFLS\_3.1*, *EaputFLS\_3.2*; 5'-RACE: *EaputFLS\_5.1*, *EaputFLS\_5.2*, *EaputFLS\_5.3*) hergestellt und zur 3'- und 5'-RACE-PCR eingesetzt (Abbildung 20). Die amplifizierten cDNA-Stücke wurden zur Klonierung und Sequenzierung in den Vektor pCR2.1 TOPO TA ligiert und die Sequenzen auf Identitätsübereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen der Genbank geprüft. Der mittels 3'-RACE-PCR ermittelte Sequenzabschnitt von 353 Basenpaaren zeigte eine Identität von 35-45 % zu verschiedenen FLS- und FHT-Sequenzen. Der Sequenzabschnitt des 5'-RACE mit einer Länge von 753 Basenpaaren wies eine Identität von 37-40 % zu verschiedenen FLS-Sequenzen, aber auch zu Sequenzen verschiedener Gibberellin 2-O-Oxidasen, auf.



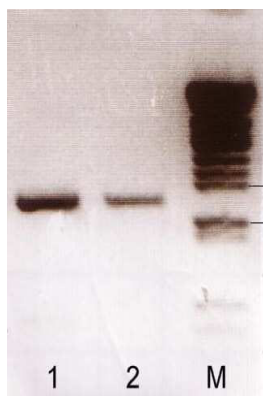
**Abbildung 20**

3'- und 5'-RACE-PCR-Amplifizierung der cDNA-Abschnitte aus *Equisetum* zur Ergänzung der Dioxygenasen-Sequenz.  
 PCR mit *Ea* Gesamt-cDNA als Template für 3'-RACE (A) und genspezifischer *Ea* cDNA für 5'-RACE (B) unter Standardbedingungen. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung lokalisiert.

1 = 45 °C; 2 = 48 °C; 3 = 50,5 °C; 4 = 53 °C; 5 = 56 °C  
 PCR-Produkt 3 wurde jeweils ligiert.

Mit Hilfe der überlappenden Enden der insgesamt drei Teilsequenzen wurde die Gesamtsequenz der cDNA ermittelt. Der kodierende Bereich dieser Sequenz wurde erneut mittels des BLAST X-Programm des NCBI-Servers analysiert und eine Identität von 33-35 % zu vielen FLS-Sequenzen, aber auch zu Sequenzen von Gibberellin 2-O-Oxidasen, gefunden.

Anhand dieser Sequenz wurden Primer zur Klonierung der Volllängen-Sequenz *Ea*ODD1 entwickelt (*EaputFLS\_EtoE\_F* und *EaputFLS\_EtoE\_R* mit Stopp-Codon, *EaputFLS\_R\_ohne* ohne Stopp-Codon). Die PCR-amplifizierte Volllängensequenz (Abbildung 21) wurde ohne Stopp-Codon in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1 (*Ea*ODD1\_pYES2.1) und mit Stopp-Codon in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert. Von dem Klonierungsvektor ausgehend konnte die Sequenz auch in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (*Ea*ODD1\_pYES2) und den Bakterienexpressionsvektor pET15b (*Ea*ODD1\_pET15b) eingebracht werden.



**Abbildung 21**

Proofreading-PCR-Amplifizierung der 2-ODD-Volllängensequenz aus *Equisetum*.

Als Template wurde *Ea* Gesamt-cDNA bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Bestrahlung nachgewiesen.

1 = PCR-Produkt mit Stopp; Primer: *EaputFLS\_EtoE\_F*, *EaputFLS\_EtoE\_R*

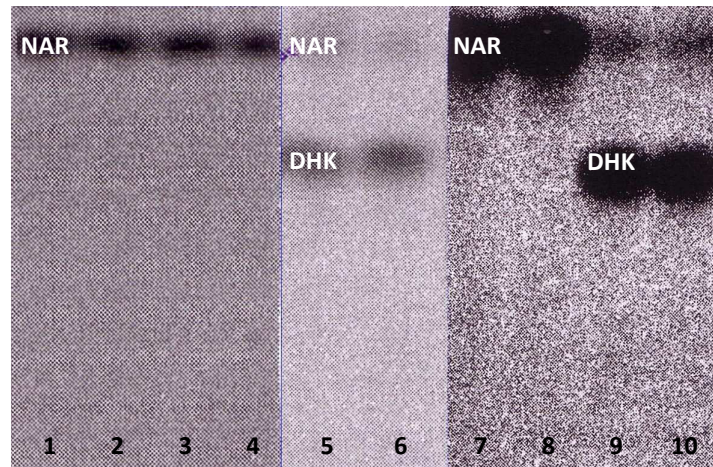
2 = PCR-Produkt ohne Stopp; Primer: *EaputFLS\_EtoE\_F*, *EaputFLS\_EtoE\_R\_ohne*

M = Lambda-PCR-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot)

## 2.2. Expression von *Ea*ODD1 in Hefen

*INVSc1*-Hefezellen wurden mit den Plasmiden *Ea*ODD1\_pYES2 oder *Ea*ODD1\_pYES2.1 transformiert und zur Selektion auf SC-U Agar-Platten ausgestrichen. Expressionskulturen wurden erstellt, die Transformanten induziert (III.9.10.2) und zur Proteinisolierung aufgeschlossen. Die Expression der Volllängensequenz ohne Stoppcodon in dem Vektor pYES2.1 liefert das Enzym mit C-terminalem His-Tag, das über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aus dem Rohextrakt isoliert werden konnte. Über Metalchelate-Affinitätschromatographie gereinigte und konzentrierte Enzyme wurden mittels Größenausschlusschromatographie in ein für 2-ODD geeignetes Puffersystem überführt (10.9.1). Sowohl diese Enzymlösungen als

auch die Rohextrakte wurden mit radioaktiv markiertem NAR oder DHK auf 2-ODD-Aktivität überprüft (Abbildung 22).



**Abbildung 22**

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität rekombinanter *Ea*ODD1.

Rohextrakt aus induzierten, *Ea*ODD1\_pYES2 (Spur 7-10) oder *Ea*ODD1\_pYES2.1 (Spur 1-2) transformierten Hefezellen bzw. das aus *Ea*ODD1\_pYES2.1 Transformanten isolierte und über Ni-Affinitätschromatographie fraktionierte Protein (Spur 3-6) wurden für Enzymtest verwendet. Als Substrat diente [ $^{14}$ C]NAR (Spur 1-4; 7,8) oder [ $^{14}$ C]DHK (Spur 5,6,9,10) und die Inkubationen wurden in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Spuren 1,3,5,7,8) oder Tris-HCl Puffer pH 7,0 (Spur 2,4,6,8,10) durchgeführt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mittels Bioimaging lokalisiert.

In diesen durchgeführten Enzymtests konnte weder ein Umsatz von NAR zu DHK oder Km noch von DHK zu Km nachgewiesen werden.

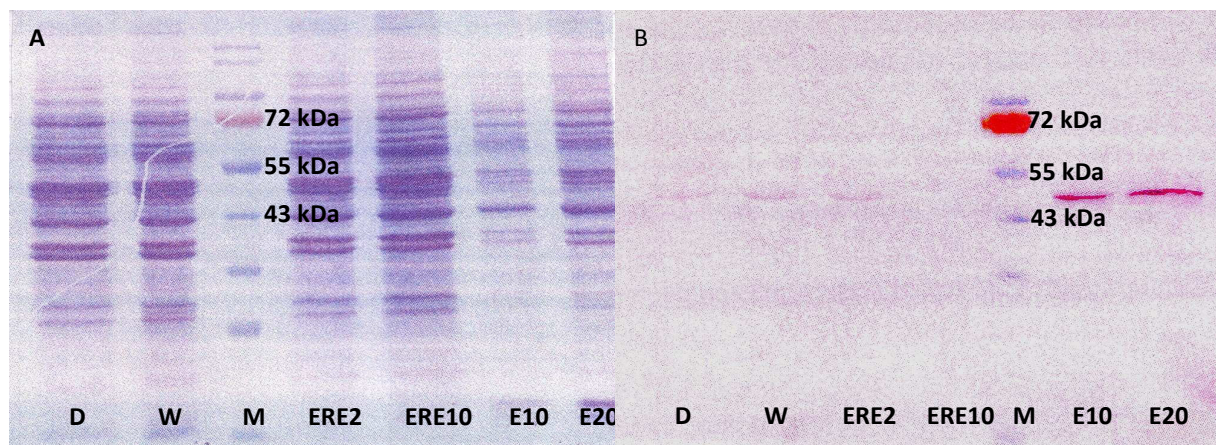
Zur zusätzlichen Aktivitätskontrolle wurden Biotransformationen mit beiden Hefeexpressionskulturen durchgeführt. Als Substrate wurden NAR und DHK in DMSO gelöst eingesetzt. Nach Analyse der Extrakte über Cellulose-DC in CAW-Fließmittel und Ansprühen mit Natriumborhydrid konnte jedoch auch hier keine Aktivität nachgewiesen werden.

### 2.3. Nachweis rekombinanter *Ea*ODD1 durch SDS-PAGE und Western-Blot

Da die rekombinant exprimierte 2-ODD aus Ackerschachtelhalm mit den angebotenen Substraten in Enzymtests und Biotransformationen nicht aktiv war, wurde die Expression des mit pYES2.1 exprimierten Proteins mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot mit V5-Epitop-Antikörper kontrolliert. Die aus der Sequenz errechnete molekulare Masse des Proteins betrug ca. 42 kDa. Aufgrund der Expression im pYES2.1-Vektor mit C-terminalen His-Tag und



V5-Epitop vergrößerte sich die Molekularmasse um 5 kDa auf 47 kDa. Zwei SDS-Gele wurden mit den verschiedenen Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung gleich beladen und aufgetrennt. Im gefärbten SDS-Gel (Abbildung 23A) lässt sich keine deutliche Überexpression im Bereich von 47 kDa erkennen. Die Proteine des zweiten SDS-Gels wurden durch Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen V5-Epitope das exprimierte Enzym detektiert; der gebundene Antikörper wurde mit Hilfe seiner gekoppelten alkalischen Phosphatase lokalisiert (Abbildung 23B). Auf diese Weise konnte die erfolgreiche Expression der 2-ODD nachgewiesen werden. Die Inaktivität des Proteins könnte auf eine mögliche Instabilität zurückzuführen sein. Diese Labilität ist für Enzyme der Klasse der 2-ODDn nicht unbekannt und führt häufig zum Funktionsverlust des Enzyms. Alternativ können bei heterologer Expression Fehlkonfigurationen auftreten, die zur Inaktivität führte.



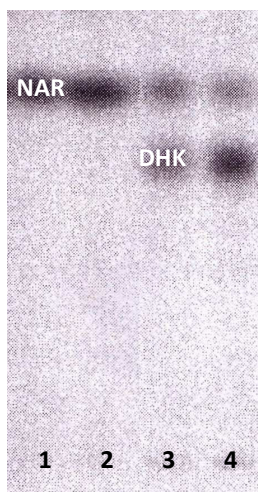
**Abbildung 23**

Expressionskontrolle von *EaODD1* in *S. cerevisiae* mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

Der Rohextrakt aus induzierten *EaODD1*\_pYES2.1 Hefetransformanten (ERE2) bzw. Fraktionen dieses Extraktes nach Ni-Affinitätschromatographie (D, W, E10, E20) und Rohextrakt aus Hefezellen, die mit dem antisense-Insert transformiert waren (Negativkontrolle; ERE10) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion gefärbt (A) oder im Western-Blot mit V5-Epitop-Antikörper (B) nachgewiesen. Die Proteinmenge im D = Durchlauf, W = Waschfraktion und E10 = Elutionsfraktion betrug pro Spur 10 µg mit Ausnahme von E20 = Elutionsfraktion (20 µg).

## 2.4. Expression in Bakterien

*E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden mit dem Plasmid *Ea*ODD1\_pET15b transformiert und zur Expression induziert. Auch in diesem Falle wurde die Enzymaktivität sowohl vom Proteinrohextrakt als auch von Fraktionen nach Metallchelate-Affinitätschromatographie (III.10.9.1) mit radioaktiv markiertem NAR oder DHK als Substrat überprüft. Weder in diesen Inkubationen noch in zusätzlich durchgeführten Versuchen zur Biotransformation konnte Enzymaktivität festgestellt werden (Abbildung 24), so dass auch hier die Identität der ODD als FLS oder FLS-ähnliches Enzym nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 24**

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität rekombinanter *Ea*ODD1.

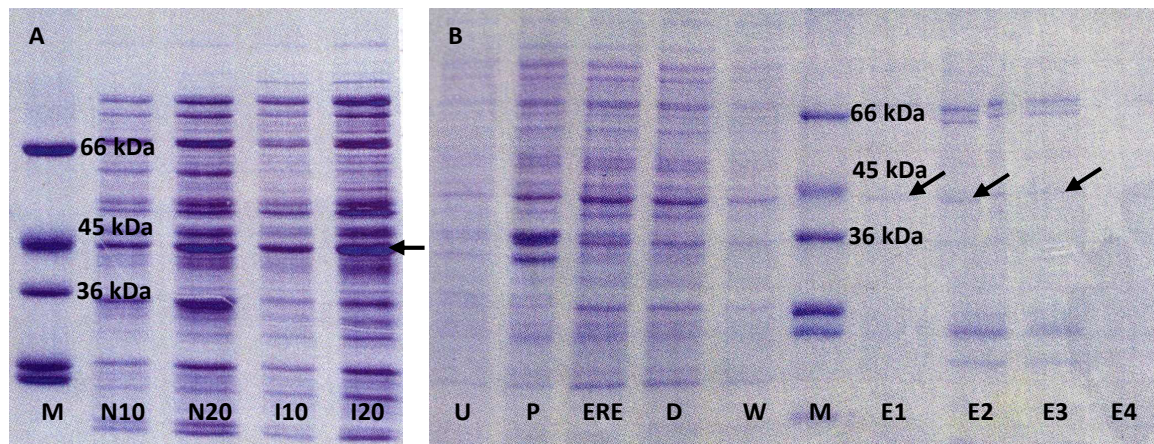
Das aus *Ea*ODD1\_pET15b Transformaten isolierte und über Ni-Affinitätschromatographie fraktionierte Protein wurde für Enzymtests verwendet. Als Substrate wurden [<sup>14</sup>C]NAR (Spur 1+2) oder [<sup>14</sup>C]DHK (Spur 3+4) eingesetzt. Die Inkubationen wurden in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Spur 1,3) oder Tris-HCl Puffer pH 7,0 (Spur 2,4) durchgeführt. Durch Extraktion mit Ethylacetat wurde die Enzymreaktion beendet, die Extrakte wurden durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mittels Bioimaging lokalisiert.

## 2.5. Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE

Zur Kontrolle der Expression wurden der Rohextrakt aus den induzierten rekombinanten *E. coli* und die Fraktionen aus der Ni-NTA-Aufreinigung durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der N-terminale His-Tag aus dem Vektor pET15b erhöht die berechnete molekulare Masse der *Ea*ODD1 um 3 kDa auf 45 kDa. In diesem Bereich ist im gefärbten SDS-PAGE-Gel des Rohextraktes eine verstärkte Bande zu erkennen (Abbildung 25A), die - wenn auch schwächer - ebenfalls im Extrakt der nicht induzierten Zellen auftritt.

Im SDS-PAGE-Gel der Fraktionen nach Ni-Affinitätsreinigung des Extrakts zeigt sich ebenfalls eine Bande auf der Höhe von 45 kDa (Abbildung 25B), die jedoch sehr schmal ist und kaum Rückschlüsse zulässt. Die Trennung durch SDS-PAGE wurde wiederholt und ein Western Blot auf PVDF-Membran durchgeführt. Die Detektion mit AntiHis-Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase, lieferte keinen Hinweis auf Expression, obwohl die

Überprüfung des Blots durch nachträgliche Färbung des Gels den vollständigen Transfer der Proteine anzeigte. Folglich konnte keine Expression eines rekombinanten Enzyms im Bakterienaufschluss nachgewiesen werden.



**Abbildung 25**

Expressionskontrolle von *EaODD1* aus *E. coli*.

Rohextrakte aus induzierten (I10, I20) und nicht induzierten (N10, N20) *EaODD1*\_pET15b

Bakterientransformanten wurden vergleichend nebeneinander durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion gefärbt (A). Zusätzlich wurden die Fraktionen nach Ni-Affinitätschromatographie (Durchlauf D, Waschfraktion W, Elutionsfraktionen E1, E2, E3, E4) neben Rohextrakten nicht induzierter (U) und induzierter (ERE) *EaODD1*\_pET15b Expressionskulturen sowie das resuspendierte Pellet (P) nach Aufschluss der Transformanten (Aufschlusskontrolle) mittels SDS-PAGE getrennt und zur Detektion gefärbt (B).

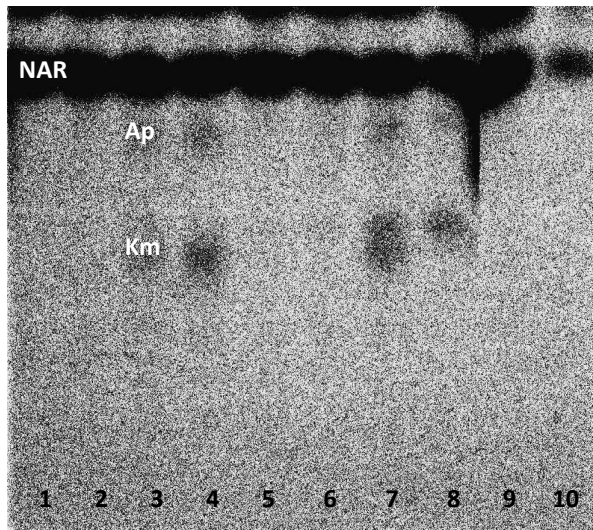
Die Proteinmenge betrug pro Spur 10 µg mit Ausnahme von N20 und I20 (20 µg)

### 3. Enzym-Reinigung

#### 3.1. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Nach erfolgloser Klonierung bzw. heterologer Expression einer 2ODD aus *E. arvense* wurde versucht, das Enzym auf traditionelle Weise aus Pflanzenextrakt anzureichern oder zu reinigen. Der Rohextrakt aus sterilen *E. arvense* Sprossen wurde sukzessive mit 30, 50 und 80 % Ammoniumsulfat gesättigt und die jeweiligen Niederschläge durch Zentrifugation gesammelt. In den Fällungen bis 50 und bis 80 % fanden sich die Enzymaktivitäten der 2-ODDn wieder (Abbildung 26). Somit wurde zur Reinigung zunächst mit 30 %iger Ammoniumsulfatsättigung gefällt und der bei 4 °C und 20.000 x g über 20 min abzentrifugierte Niederschlag verworfen. Der anschließend mit 80 %iger Ammoniumsulfatsättigung gefällte Niederschlag wurde nach Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g für 20 min vom Überstand getrennt und in 50 ml auf 4 °C gekühltem Puffer A aufgenommen.



**Abbildung 26**

Nachweis der 2ODD-Enzymaktivität im *Equisetum*-Pflanzenextrakt nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung.

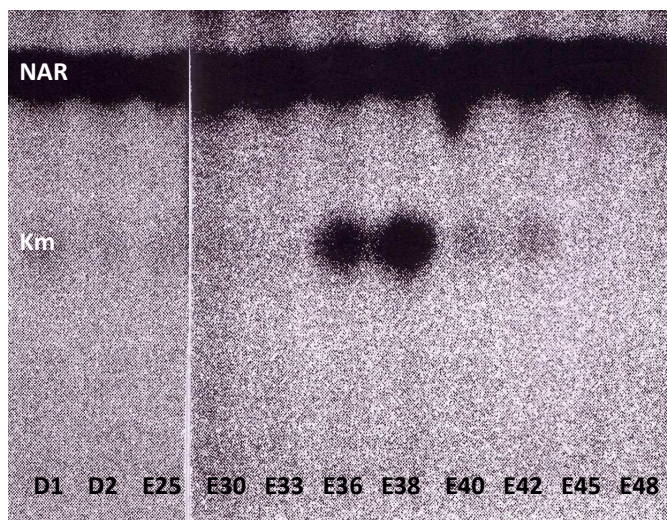
Die Tests wurden unter Standardbedingungen mit resuspendiertem Pellet der 30 %igen Fällung (Spur 1,2), resuspendiertem Pellet der 50 %igen Fällung (Spur 3,4),

Überstand der 50 %igen Fällung (Spur 5,6), resuspendiertem Pellet der 80 %igen Fällung (Spur 7,8) und Überstand der 80 %igen Fällung (Spur 9,10) durchgeführt.

Als Substrat diente [ $^{14}$ C]NAR. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mittels Bioimaging Analyse detektiert.

### 3.2. Reinigung durch HIC

Die in Puffer A aufgenommene Proteinlösung wurde auf eine HIC-Säule gegeben und so lange mit Puffer A gespült, bis im Durchlauf kein Protein mehr gemessen werden konnte. Dann wurde die Säule mit einem linearen Gradienten von 100 % Puffer A (1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) bis 100 % Puffer B (0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) eluiert (III.10.9.2), das Eluat in 1 ml-Fractionen gesammelt und sowohl der Durchlauf als auch die Fractionen mit radioaktiv markiertem NAR auf 2-ODD-Aktivität geprüft. Eine geringe Aktivität wurde im Durchlauf gemessen, wohingegen die Hauptaktivität in den Fractionen 34 bis 42 detektiert werden konnte. In den ausgewerteten Enzymtests konnte lediglich der Umsatz von NAR zu Km, aber nicht mehr zu Ap nachgewiesen werden (Abbildung 27).

**Abbildung 27**

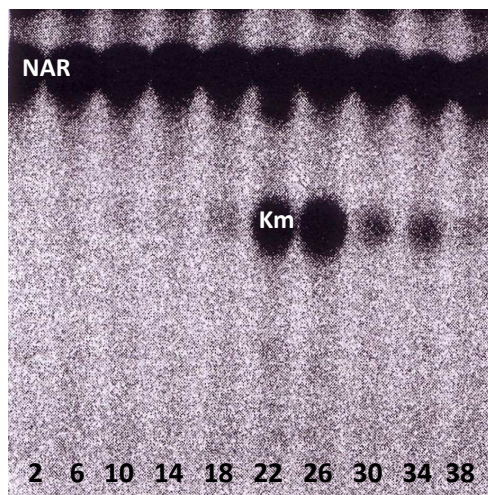
Nachweis der 2ODD-Enzymaktivität im *Equisetum*-Pflanzenextrakt nach HIC.

Durchlauf-Fractionen (D1, D2) und Elutions-Fractionen (E25-E48) der chromatographischen Auftrennung wurden für Aktivitätstests unter Standardbedingungen und [ $^{14}$ C]NAR als Substrat eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und durch Bioimaging ausgewertet.

Die Kontrolle der Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE (Abbildung 30) zeigte, dass die Ammoniumsulfat-Fraktionierung und hydrophobe Interaktionschromatographie bereits große Mengen Begleitprotein abgetrennt hatten. Eine markante Bande, die dem gesuchten Protein bzw. den Proteinen entsprechen könnte, konnte jedoch nicht ausgemacht werden.

### 3.3. Reinigung durch SEC

Die Fraktionen mit FLS-Aktivität nach HIC wurden vereinigt, das Protein bei 80 % Ammoniumsulfat gefällt, in geringem Volumen (ca. 1 ml) Puffer B wieder aufgenommen und auf eine SEC-Säule gegeben (III.10.9.2). Dabei bestimmt die Porengröße der Matrixpartikel die Trennleistung, indem kleinere Proteine verzögert eluiert werden. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und mit markiertem NAR auf Enzymaktivität geprüft (Abbildung 28). Durch diesen Reinigungsschritt konnten einige Proteine mit kleinerem Molekulargewicht entfernt werden (Abbildung 30).



**Abbildung 28**

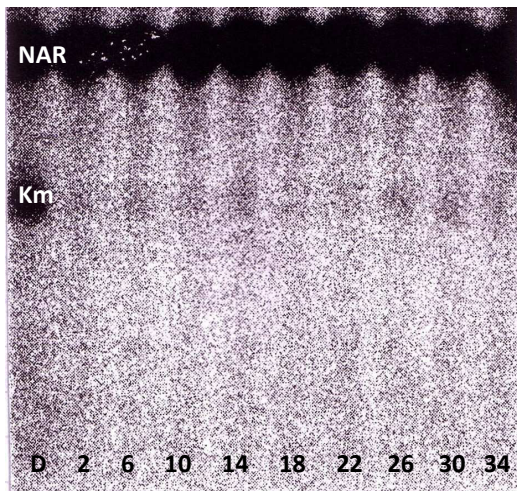
Nachweis der *Eα*FLS-Aktivität nach SEC. Die Fraktionen 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 der SEC wurden zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Die Tests wurden unter Standardbedingungen mit [ $^{14}$ C]NAR als Substrat durchgeführt. Die Inkubationen wurden durch Ethylacetatextraktion beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und anhand anschließendem Bioimaging der radioaktiven Substanzen ausgewertet.

### 3.4. Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie

Das Eluat der SE-Chromatographie mit FLS-Aktivität (Fraktionen 18-34 in Abbildung 28) wurde zur weiteren Auftrennung auf eine Fraktogel-DEAE-Säule gegeben. Allerdings wurde unter den gewählten Bedingungen (Puffer, pH, Salzstärke) fast die gesamte Enzymaktivität im Durchlauf wiedergefunden (Abbildung 29), währenddessen nur eine geringe

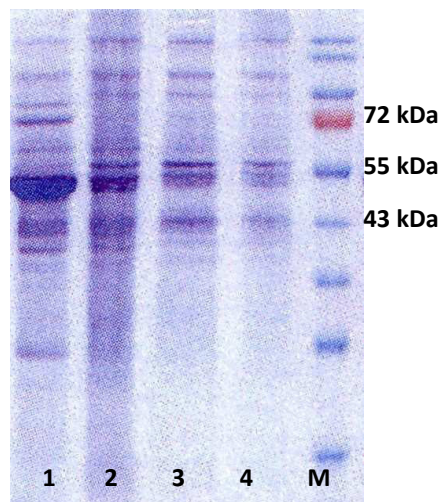


Hintergrundaktivität über die gesamte Breite der Elutionsfraktionen festgestellt werden konnte. Auf diese Weise konnte keine weitere Aufreinigung erzielt werden.



**Abbildung 29**

Nachweis der *EaFLS*-Aktivität nach Anionenaustauschchromatographie. Die Durchlaufraction (D) und Elutionsfraktionen (2-34) der chromatographischen Auftrennung wurden für Aktivitätstests eingesetzt. Unter Standardbedingungen wurde [ $^{14}\text{C}$ ]NAR als Substrat verwendet. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und durch Bioimaging lokalisiert.



**Abbildung 30**

Proteinmuster nach verschiedenen Fraktionierungen der nativen FLS aus *E. arvense*.

Der Pflanzenrohextrakt (Spur 1) wurde über HIC (Spur 2), SEC (Spur 3) und anschließend IEX (Spur 4) aufgereinigt.

Mittels SDS-PAGE wurden die unterschiedlichen Fraktionen aufgetrennt und zur Detektion gefärbt.

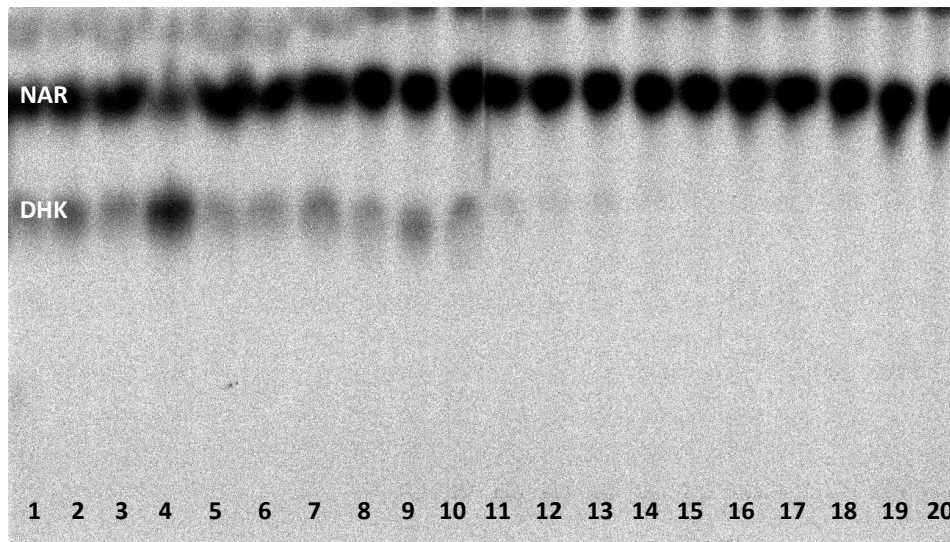
Pro Spur wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen

### 3.5. Affinitäts-Chromatographie

Nach fehlgeschlagener rekombinanter Expression und Trennung mittels Ni-Affinitätschromatographie sowie bisher ungenügender Reinigung des nativen Enzyms in den ersten Schritten sollte die Aufreinigung durch eine Affinitätschromatographie ergänzt und verbessert werden. Dazu musste das Trennmateriel neu konzipiert werden.

Zunächst wurde versucht 2-Oxoglutarat an eine Epoxy-aktivierte Sepharose zu koppeln, um so eine Bindungsstelle für das Enzym auf der Säule zu schaffen, die mittels Verdrängung mit 2-Oxoglutarat wieder gelöst werden könnte (III.10.9.2; Anzellotti und Ibrahim, 2000). Zur

Validierung der Methode wurde eine rekombinante 2-ODD mit ausreichender Aktivität verwendet (FHT aus *Petersilie*). Nach Beladen wurde die Säule so lange mit dem Bindepuffer gespült, bis im Durchlauf keine Proteine mehr nachweisbar waren. Anschließend wurde mit unterschiedlichen 2-Oxoglutarat-Konzentrationen eluiert. Eluat und Durchlauf wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt. In den Elutionsfraktionen konnten jedoch keine Proteine nachgewiesen werden. Die enzymatische Überprüfung ergab eine weit verteilte Aktivität in den Durchlaufraktionen, die NAR zu DHK umsetzten, während im Eluat mit 2-Oxoglutarat keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abbildung 31). Auch Versuche zur Optimierung der Kopplungsreaktionen durch Verschieben des pH-Wertes (möglichst basisch pH 11) oder Verlängerung der Reaktionszeit (über Nacht) des Säulenmaterials mit 2-Oxoglutarat konnten dieses Ergebnis nicht verändern.



**Abbildung 31**

Nachweis der *PcFHT*-Aktivität nach 2-Oxoglutarat-Affinitätschromatographie.

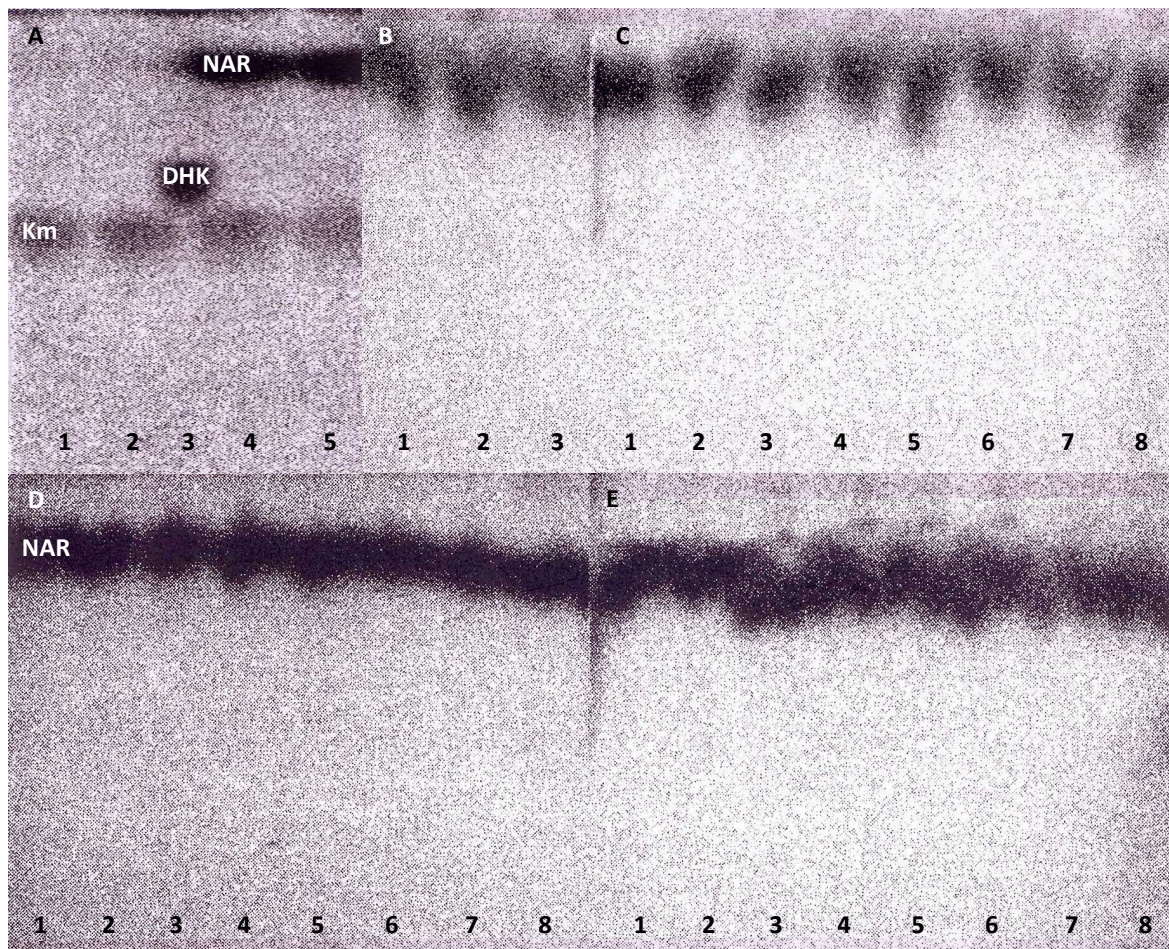
Die Durchlaufraktionen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 (Spur 1-14) und die Elutionsfraktionen 2, 4, 6, 8, 10, 12 (Spur 15-20) wurden für Enzymtests verwendet. Die Tests wurden unter Standardbedingungen mit [ $^{14}$ C]NAR als Substrat durchgeführt.

Durch Extraktion mit Ethylacetat wurden die Inkubationen beendet, die Extrakte wurden durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mittels Bioimaging detektiert.

Alternativ wurden auf Basis der Ni-NTA-Agarose-Säule für His-Tag-Aufreinigung weitere Säulen mit unterschiedlichen zweiwertigen Kationen hergestellt, um die Bindung von 2-ODDn an zweiwertigen Metallionen auszunutzen (Britsch und Grisebach, 1986). Auch hier wurden zur Etablierung der Methode Enzymrohextrakte der bereits bekannten und aktiv getesteten, rekombinanten FLS aus *A. thaliana* (exprimiert von Vektor pDEST14 in BL21A1



Zellen) genutzt. Während der Rohextrakt der FLS aus *Arabidopsis* gute Umsätze von NAR und DHK zu Km zeigte (Abbildung 32A), konnte in den Eluatfraktionen der Affinitätschromatographie keine Enzymaktivität festgestellt werden (Abbildung 32B-E). Das Eluat wurde nicht dialysiert, jedoch durch das Prinzip der Größenausschlusschromatographie in einen Metallionen-freien Puffer überführt.



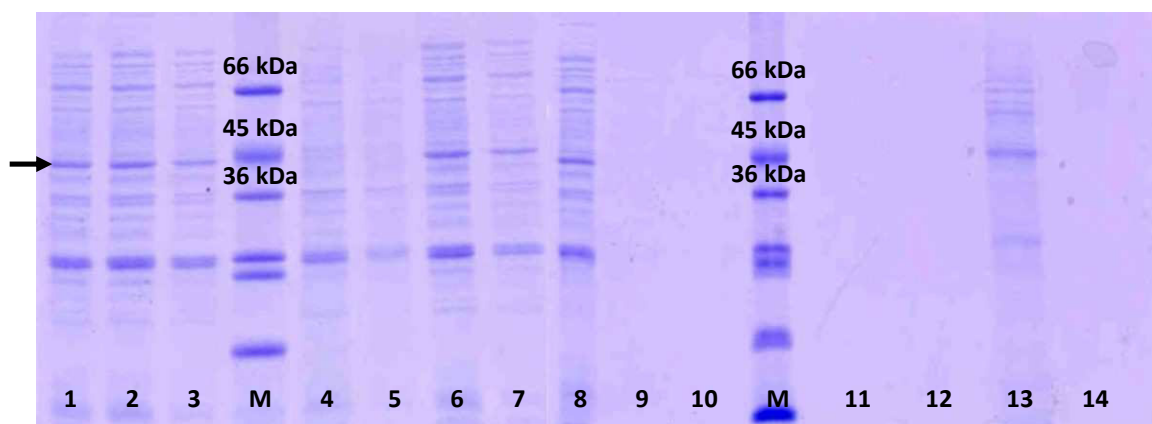
**Abbildung 32**

Nachweis der AtFLS-Aktivität nach  $\text{Me}^{2+}$ -Affinitätschromatographie.

Der Rohextrakt der rekombinanten AtFLS (A, Spur 1-4) sowie über Affinitätschromatographien erhaltenen Durchlaufraktionen (B, Spur 1-3) und Eluate (C-E, jeweils Spur 1-8) wurden zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Bei den getesteten Durchlaufraktionen (B) wurden die drei  $\text{Me}^{2+}$ -Affinitätschromatographien  $\text{Ni}^{2+}$  (Spur 1),  $\text{Cu}^{2+}$  (Spur 2),  $\text{Co}^{2+}$  (Spur 3) nebeneinander ausgewertet. Die Eluate 1-8 (jeweils Spur 1-8) der Chromatographie wurden nach den beteiligten Metallionen  $\text{Ni}^{2+}$  (C),  $\text{Cu}^{2+}$  (D),  $\text{Co}^{2+}$  (E) getrennt dargestellt. Die Tests wurden unter Standardbedingungen mit  $[^{14}\text{C}]\text{NAR}$  bzw.  $[^{14}\text{C}]\text{DHK}$  (nur A Spur 1+2) als Substrat durchgeführt.

Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte wurden durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mittels Bioimaging detektiert.

Zur Kontrolle wurden die Fraktionen der  $\text{Me}^{2+}$ -Affinitätschromatographie auch durch SDS-PAGE überprüft. Das Gesamtprotein der jeweils zweiten und dritten von acht Eluatfraktionen wurde mit Trichloressigsäure gefällt und zur Trennung auf das Gel geladen. Diese Fraktionen wurden ausgewählt, da sie in Anlehnung an die Ni-NTA-Agarose Reinigung von rekombinanten His-Tag Enzymen die höchste Proteinkonzentrationen enthalten sollten. Nur das Eluat der  $\text{Co}^{2+}$ -NTA-Säule (Spur 13) enthielt signifikante Proteinmengen (Abbildung 33). Aufgrund des Aktivitätsverlustes der Dioxygenasen, der über diese Affinitätssäule auftritt, konnte die Methode leider nicht zur Reinigung von Dioxygenasen aus Ackerschachtelhalm herangezogen werden.



**Abbildung 33**

Kontrolle der AtFLS-Reinigung mittels SDS-PAGE nach Metall-Affinitätschromatographie. Der Rohextrakt aus induzierten AtFLS-Bakterien-Expressionskulturen (Spur 1,8), die Durchläufe und Waschfraktionen der Fraktionierungen dieses Extraktes mit  $\text{Ni}^{2+}$  - (2,3),  $\text{Cu}^{2+}$  - (4,5) und  $\text{Co}^{2+}$  - (6,7) Affinitätschromatographien sowie die 2. und 3. Eluate der  $\text{Ni}^{2+}$  - (9,10),  $\text{Cu}^{2+}$  - (11,12) und  $\text{Co}^{2+}$  - (13,14) Affinitätschromatographien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion angefärbt. Pro Spur wurden 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aufgetragen bzw. die Elutionsfraktionen ganz gefällt und aufgetragen.

## 4. Klonierung aus einer cDNA-Bank

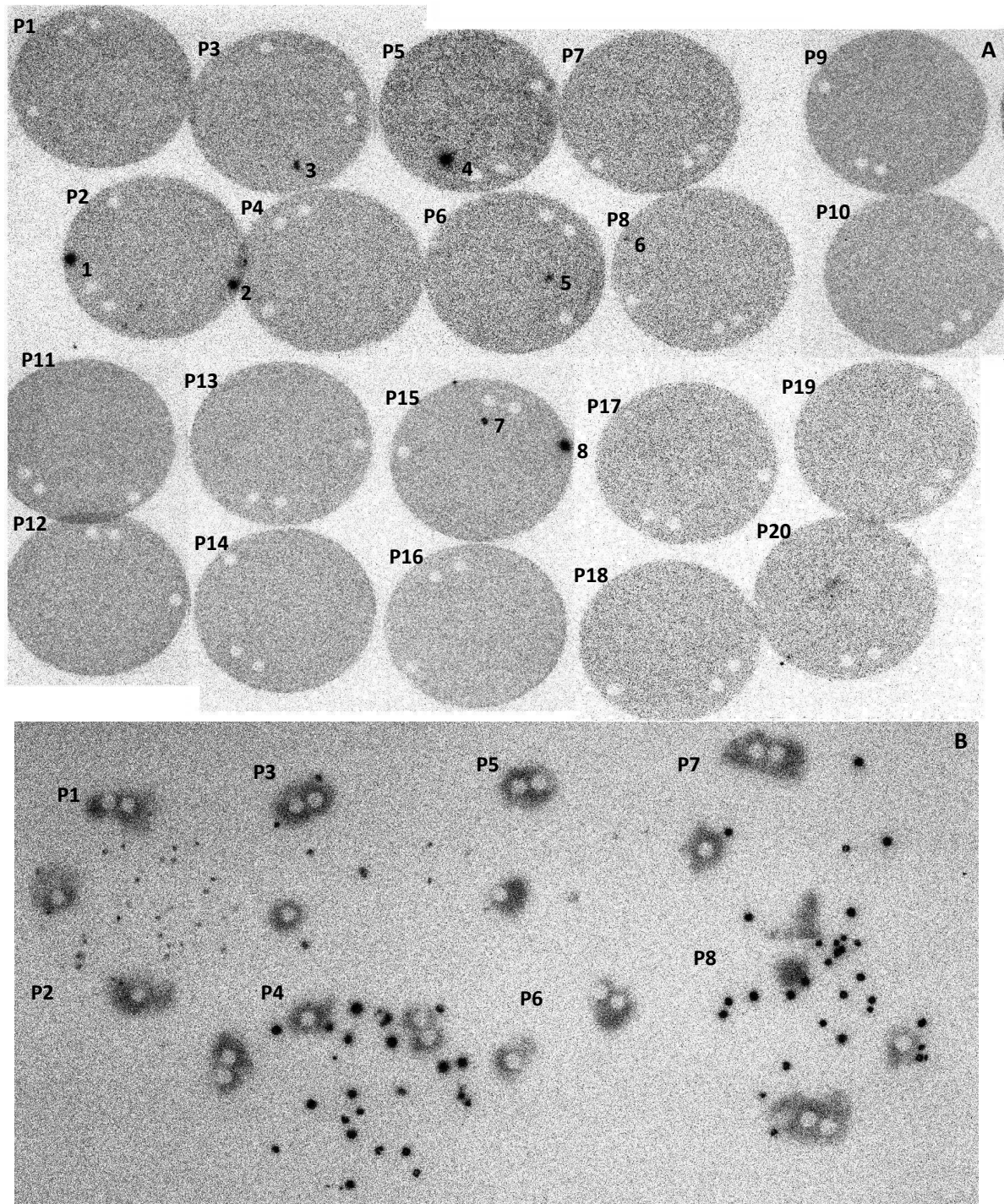
### 4.1. Screening einer cDNA-Bank in Phagen

Da die traditionelle Reinigung der FLS aus dem *E. arvense* Rohextrakt nur partiell erfolgreich war und die direkte cDNA-Amplifizierung mit degenerierten cDNA-Primern zu einer Sequenz führte, deren Identität nicht durch Expression bewiesen werden konnte, bot sich als dritte Alternative die Erstellung einer cDNA-Bank in Phagen zur Klonierung einer 2-ODD an. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass im Idealfall alle Transkripte von *E. arvense* in Form der cDNA in der Bank vorliegen. Wichtiger Teil dieser Methode ist das sorgfältige anschließende Screening. Bei verschiedenen Temperaturen wurden Hybridisierungen mit [<sup>32</sup>P]markierten Sonden aus FLS- und FHT-cDNA aus Petersilie durchgeführt, zunächst bei mittleren Temperaturen von 54 °C im ersten und 55 °C im zweiten Screening. Diese Screenings lieferten schwache, nicht eindeutige Signale und wurden mit weniger stringenten Waschschritten wiederholt. Da auch hier die Signale nicht ausgewertet werden konnten, wurde die Hybridisierung bei niedrigeren Temperaturen von 49 °C und 50 °C wiederholt, welches allerdings auch nicht zur eindeutigen Identifizierung einzelner Klone führte. Deshalb wurde die Methode zunächst mit einer homologen CHS-cDNA als Sonde validiert.

### 4.2. Methoden-Kontrolle mit homologer CHS-cDNA (*EaCHS*)

*EaCHS*-cDNA wurde mit d[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP markiert und als Sonde zur Selektion der cDNA-Bank eingesetzt. Im ersten Screening wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C inkubiert (Abbildung 34A). Positive Plaques wurden ausgestochen, eluiert und im zweiten Screening die Hybridisierung der Sonde überprüft. Die Hybridisierungstemperatur wurde auf 61 °C erhöht, um falsch positiv hybridisierte Plaques des ersten Screenings auszuschließen (Abbildung 34B).





**Abbildung 34**

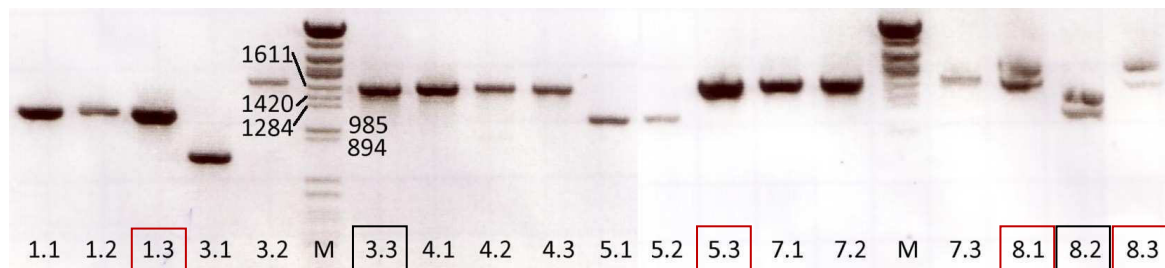
Darstellung der markierten Plaques durch Hybridisierung mit [ $^{32}\text{P}$ ]EaCHS-Sonde und Bioimaging nach Fixierung auf Nylon Transfermembran.

8 positive Plaques (1-8) konnten bei dem 1. Screening über 20 Platten (P1-20) mittels Bioimaging detektiert werden (A). Nach Ausstechen und Elution der Phagen wurden diese zum 2. Screening auf je einer Platte eingesetzt (P1-8; B) und positive Plaques mit Hilfe der radioaktivmarkierten Sonde im Bioimaging Analyzer sichtbar gemacht. Platten mit überwiegend radioaktiven Signalen wurden als positiv bewertet.

Die Membrane des 2. Screenings wurden nach der Hybridisierung sehr intensiv gewaschen, um den Hintergrund zu minimieren. Aus diesem Grund war die Benetzung der Markierungsstellen mit radioaktiver Hybridisierungslösung notwendig, um die Plaques zuordnen zu können.



Je Platte mit überwiegend positiv detektierten Plaques wurden drei positive Plaques ausgestochen, die Phagen eluiert und das Insert der Phagen-DNA mittels PCR amplifiziert (Abbildung 35). Für die Amplifikation wurden die Primer ExCellr und ExCellf verwendet, die vor und nach der eingefügten cDNA auf dem Phagen-Vektor binden. PCR-Produkte mit einer Länge von über 1000 bp wurden zur Sequenzierung eingeschickt. Bei gleich langen PCR-Produkten von Plaques der gleichen Platte wurde nur ein PCR-Produkt sequenziert, da davon auszugehen ist, dass es sich um die gleichen Sequenzen handelt (Abbildung 35). Die Sequenzierung ergab, dass 4 der 6 eingeschickten PCR-Produkte eine Identität von 98 % zur bereits bekannten CHS aus Ackerschachtelhalm aufwiesen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode zuverlässig durchführbar und die Qualität der cDNA Bank ausreichend war.

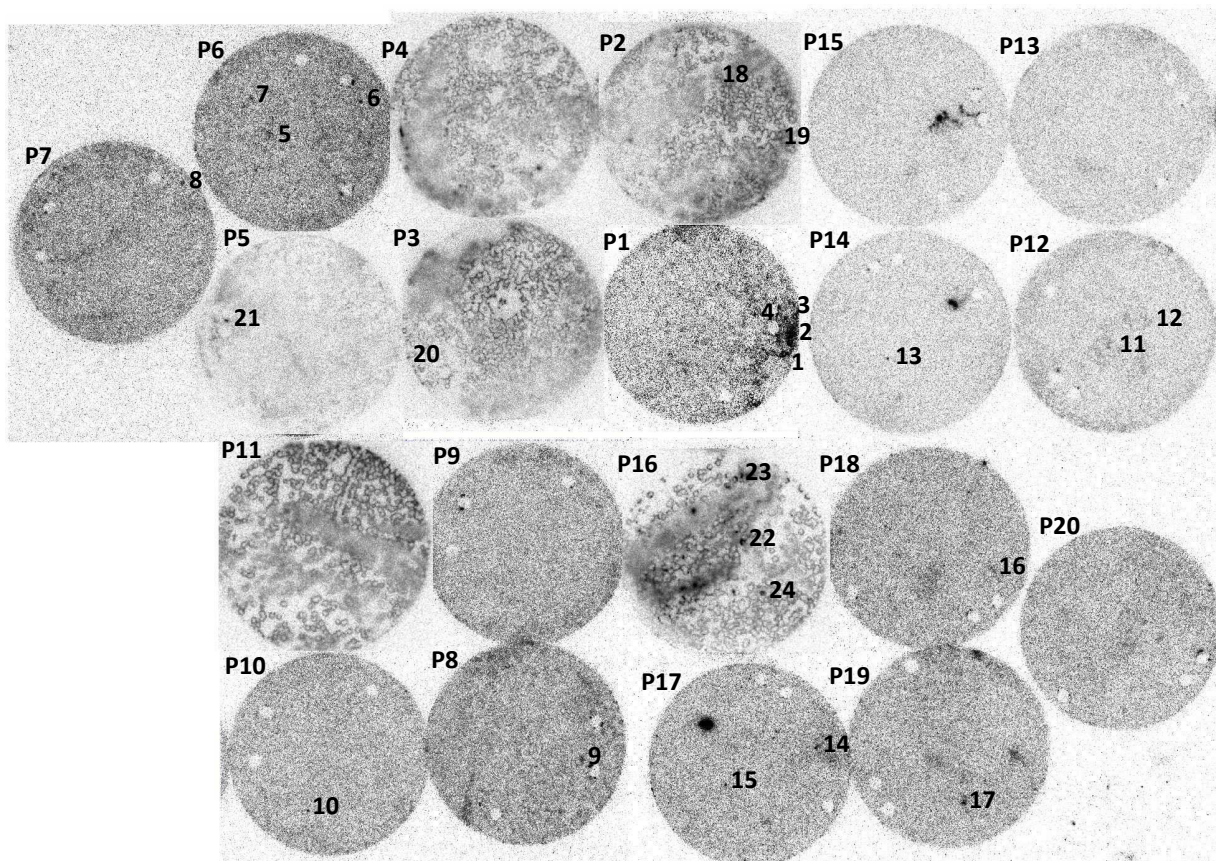


**Abbildung 35**

Auswertung der PCR-Amplifizierung CHS-rekombinanter Phagen mittels Agarosegel-Elektrophorese. Als Template wurden die eluierten Phagen positiver Plaques der Platten 1 (1.1, 1.2, 1.3), 3 (3.1, 3.2, 3.3), 4 (4.1, 4.2, 4.3), 5 (5.1, 5.2, 5.3), 7 (7.1, 7.2, 7.3) und 8 (8.1, 8.2, 8.3) des 2. Screenings verwendet. Die Anlagerung fand mit den Phagen-Primern ExCellr und ExCellf bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C statt. Markierungen der PCR-Produkt-Nummern geben an, welche Sequenzen in der Sequenzierung der CHS aus *Equisetum* entsprachen (rot) und welche falsch positiv detektiert wurden (schwarz).

#### 4.3. Screening mit verschiedenen 2-ODDn

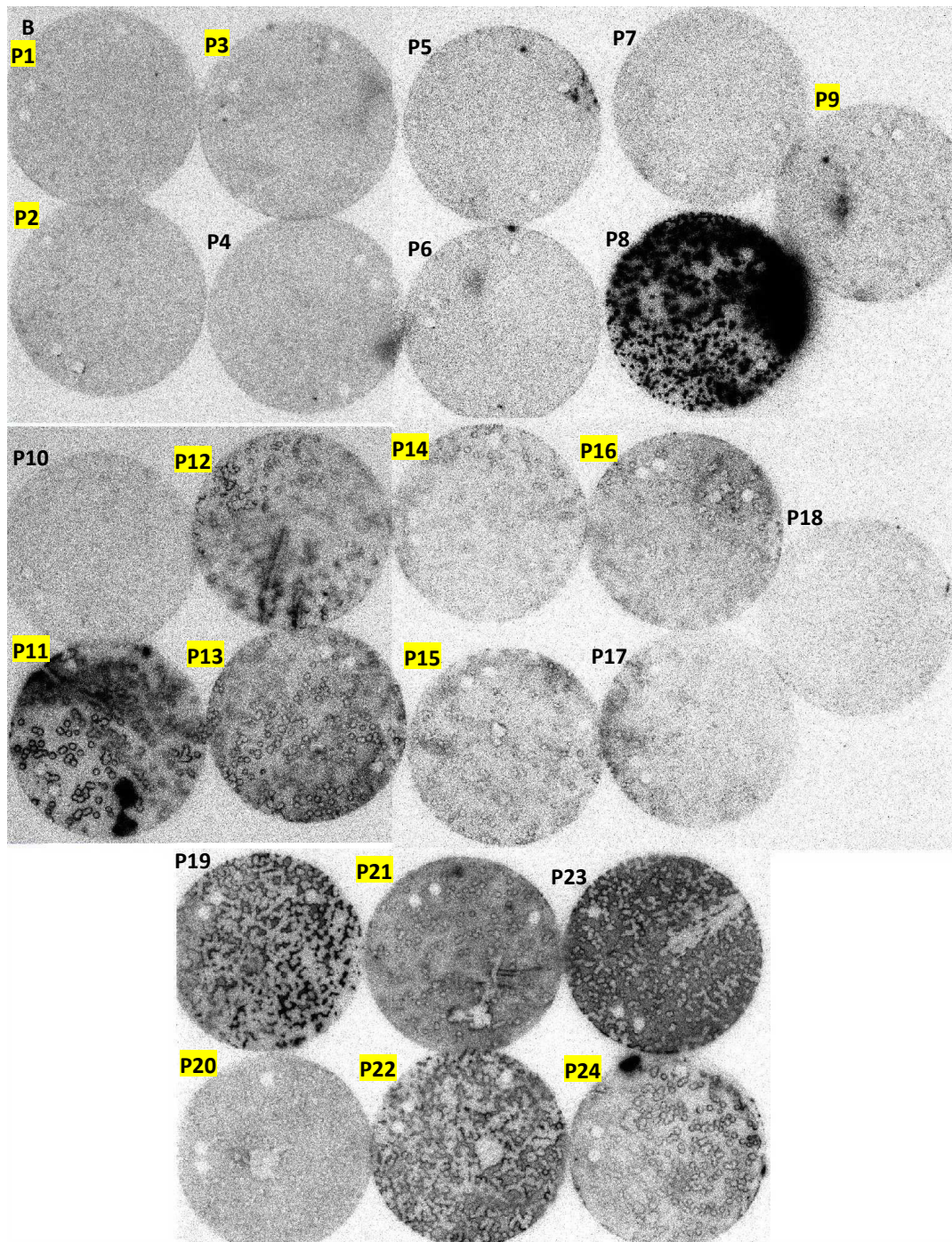
Da eine Zuordnung der verantwortlichen 2-ODDn zur nachgewiesenen Reaktion aus Ackerschachtelhalm nicht möglich war, wurde ein Gemisch aus vier unterschiedlichen 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese als Sonde eingesetzt, das aus einem äquimolaren Mix der cDNA-Sequenzen von FHT, FNS und FLS aus *P. crispum* (*PcFHT*, *PcFNS*, *PcFLS*) sowie der ANS aus *Gerbera hybrida* (*GhANS*) bestand (III.9.4.3; III.9.4.4). Die erste Hybridisierung wurde bei einer Temperatur von 52 °C und das zweite Screening bei 53 °C durchgeführt (Abbildung 36+37).



**Abbildung 36**

Darstellung der markierten Plaques durch Hybridisierung mit heterologer [ $^{32}\text{P}$ ]-2-ODN-Sonde nach Fixierung auf Nylon Transfermembran (1. Screening).  
 Die Sonde enthielt die amplifizierten cDNA-Sequenzen *PcFHT*, *PcFNS*, *PcFLS* und *GhANS* in äquimolaren Anteilen. 24 positive Plaques (1-24) wurden beim 1. Screening über 20 Platten (P1-20) mittels Bioimaging detektiert.





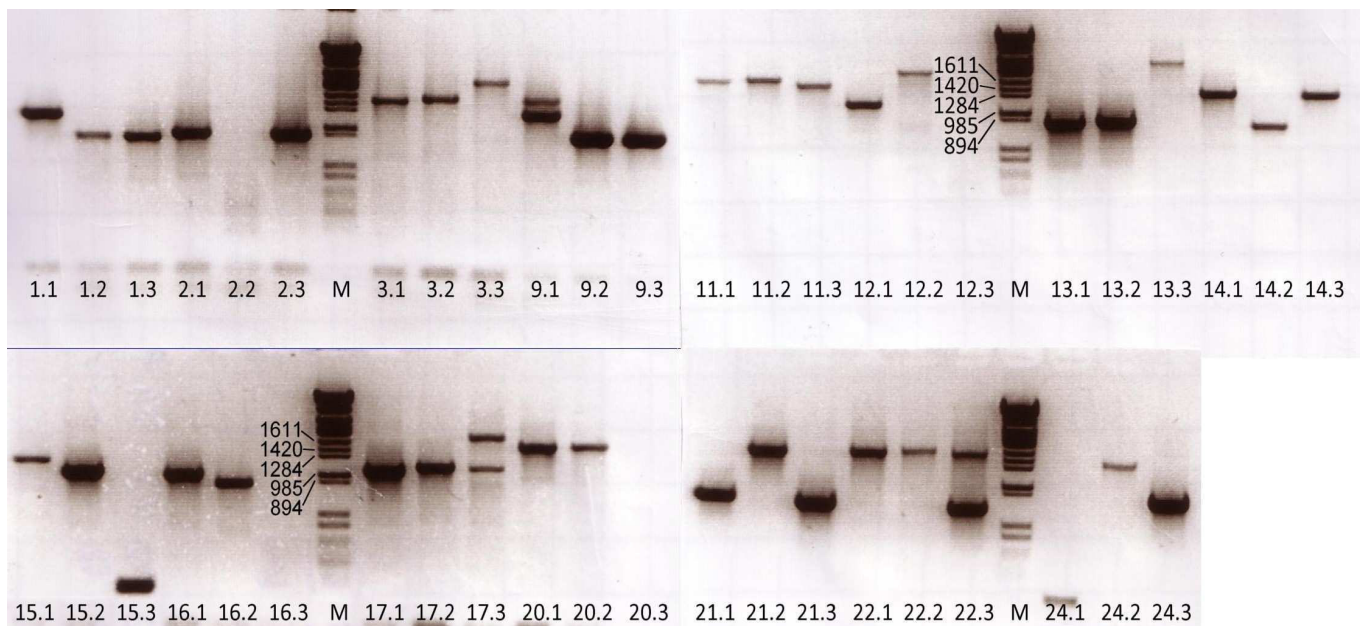
**Abbildung 37**

Darstellung der markierten Plaques durch Hybridisierung mit heterologer [ $^{32}$ P]-2-ODN-Sonde nach Fixierung auf Nylon Transfermembran (2. Screening).

Die Sonde enthielt die amplifizierten cDNA-Sequenzen *PcFHT*, *PcFNS*, *PcFLS* und *GhANS* in äquimolaren Anteilen. Platten mit überwiegenden positiven Plaques wurden als Bestätigung des positiven Signals im 1. Screening bewertet (gelb markiert). Die Übrigen galten als falsch positive Plaques des 1. Screenings.

Die radioaktiven Verbindungen wurden mittels Bioimaging lokalisiert.

Von den Platten des 2. Screenings mit überwiegend positiv detektierten Plaques wurden, wie in der Kontrolle mit CHS-cDNA, je 3 Plaques ausgestochen, die Phagen eluiert und die Inserts mittels PCR bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C mit den Primern ExCellr und ExCellf amplifiziert (Abbildung 38). Amplifikate über 1000 bp wurden zur Sequenzanalyse eingeschickt. Aus den analysierten Sequenzen konnte nur eine Sequenz mit signifikanter Homologie zu bekannten Dioxygenasen in der Flavonoidbiosynthese zugeordnet werden. Diese Sequenz von 993 bp zeigte eine Identität von 50-54 % zu verschiedenen FLS-ähnlichen publizierten cDNA-Sequenzen und etwa 30 % Identität zu Gibberellin 2-O-Oxidase.



**Abbildung 38**

Auswertung der PCR-Amplifizierung von rekombinanten Phagen aus Plaques des 2. Screenings.

Als Template wurden die eluierten Phagen positiver Plaques der Platten 1 (1.1, 1.2, 1.3), 2 (2.1, 2.2, 2.3), 3 (3.1, 3.2, 3.3), 9 (9.1, 9.2, 9.3), 11 (11.1, 11.2, 11.3), 12 (12.1, 12.2, 12.3), 13 (13.1, 13.2, 13.3), 14 (14.1, 14.2, 14.3), 15 (15.1, 15.2, 15.3), 16 (16.1, 16.2, 16.3), 17 (17.1, 17.2, 17.3), 20 (20.1, 20.2, 20.3), 21 (21.1, 21.2, 21.3), 22 (22.1, 22.2, 22.3) und 24 (24.1, 24.2, 24.3) des 2. Screenings verwendet. Die Anlagerung fand mit den Phagen-Primern ExCellr und ExCellf bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C statt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung lokalisiert.

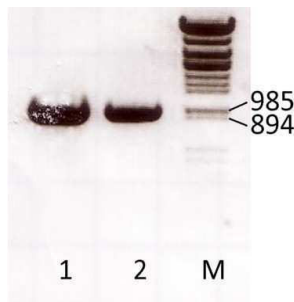
In der Sequenzanalyse konnte das PCR-Produkt 22.1 einer Dioxygenase zugeordnet werden.

#### 4.4. Klonierung einer 2-ODD aus *E. arvense* (*EaODD2*)

Zur Bestätigung der Identität dieser aus der cDNA-Bank selektierten Sequenz wurden Vollängen-Primer für die Klonierung der cDNA entwickelt. Die Primer, *EaFLS22.1f* und *EaFLS22.1rMS* (mit Stopp-Codon) bzw. *EaFLS22.1rOS* (ohne Stopp-Codon), wurden bei einer



Anlagerungstemperatur von 55 °C zur Amplifizierung unter Standardbedingungen eingesetzt (Abbildung 39) und das Amplicon in den Vektor pCR8 TOPO TA ligiert. Mit einer Clonase-Reaktion wurde die Sequenz mit Stopp-Codon in den Bakterienexpressionsvektor pDEST17 (*Ea*ODD2\_pDEST17) überführt (III.9.7), während die Sequenz ohne Stopp-Codon in den Hefeexpressionsvektor pYES-DEST52 ligiert wurde (*Ea*ODD2\_pYES-DEST52).



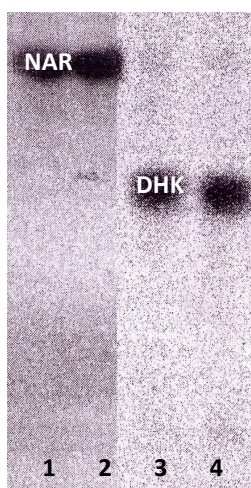
**Abbildung 39**

Proofreading-PCR-Amplifizierung der zweiten 2-ODD-Volllängensequenz aus *Equisetum*.

Als Template wurde *Ea* Gesamt-cDNA mit den Primern *Ea*FLS22.1f und *Ea*FLS22.1rMS (mit Stopp-Codon, Spur 1) bzw. *Ea*FLS22.1rOS (ohne Stopp-Codon, Spur 2) bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C eingesetzt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Bestrahlung nachgewiesen.

#### 4.5. Expression in Hefe

*INVSc1*-Hefezellen wurden mit dem Plasmid *Ea*ODD2\_pYES-DEST52 transformiert und diese zur Expression des gewünschten Proteins induziert (III.9.10.2). Zur Biotransformation wurde den rekombinanten Zellen DHK oder NAR zugesetzt, wobei jeweils nach 0, 5, 17 und 24 h Proben zur Umsatzbestimmung entnommen wurden. Zudem wurden die Hefezellen mit verschiedenen Puffern (KPi pH 6,0 und Tris-HCl 7,0) aufgeschlossen und die Proteinrohextrakte nach Abzentrifugieren der Zellbruchstücke mit radioaktiv markiertem NAR oder DHK als Substrat auf Aktivität getestet (Abbildung 40). In keinem der beschriebenen Tests konnte eine Aktivität detektiert werden.



**Abbildung 40**

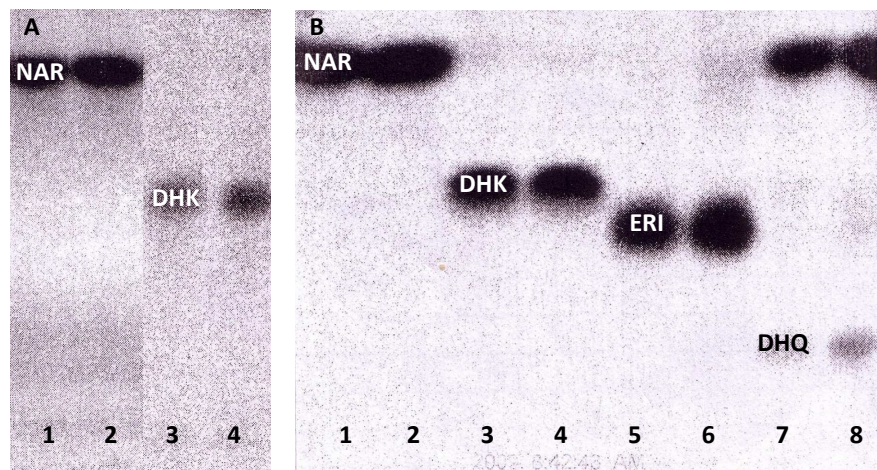
Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität der rekombinanten *Ea*ODD2.

Der Rohextrakt induzierter, mit *Ea*ODD2\_pYES-DEST52 transformierter Hefezellen wurde für den Enzymtest mit [<sup>14</sup>C]NAR (Spur 1+2) und [<sup>14</sup>C]DHK (Spur 3+4) als Substrat verwendet. Die Aktivität wurde in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Spur 1,3) oder in Tris-HCl Puffer pH 7,0 (Spur 2,4) gemessen.

Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat gestoppt, durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und mittels Bioimaging detektiert.

#### 4.6. Expression in Bakterien

*E. coli*-Stamm BL21 A1 wurde mit dem durch Clonase-Reaktion erhaltenen Expressionsplasmid *Ea*ODD2\_pDEST17 transformiert und die Bakterienkultur durch Zugabe von Arabinose zur Bildung der *Ea*ODD2 induziert. Der Rohextrakt dieser Kultur in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 oder Tris-HCl-Puffer pH 7,0 wurde mit radioaktiv markiertem NAR bzw. DHK auf 2-ODD-Aktivität geprüft. Der Aktivitätstest wurde ebenso nach Fraktionierung über Ni-NTA-Agarose und Überführung in einen Metallionen-freien Puffer mit radioaktiv markiertem NAR, DHK, ERI bzw. DHQ durchgeführt. Auch in diesen Enzymtests konnte kein Umsatz festgestellt werden (Abbildung 41).



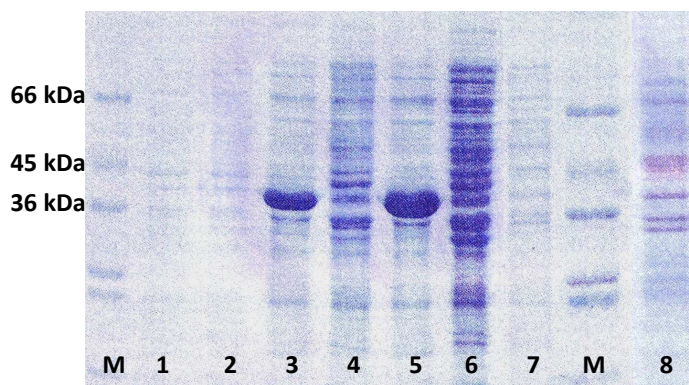
**Abbildung 41**

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität rekombinanter *Ea*ODD2.

Der Rohextrakt induzierter, mit *Ea*ODD2\_pDEST17 transformierter Bakterienzellen (A) und über Ni-Affinitätschromatographie fraktionierte Proteine des Rohextraktes (B) wurden für Enzymtests verwendet. Als Substrate diente [ $^{14}$ C]NAR (je Spur 1+2), [ $^{14}$ C]DHK (je Spur 3+4), [ $^{14}$ C]ERI (Spur 5+6) bzw. [ $^{14}$ C]DHQ (Spur 7+8). Die Inkubationen wurden in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (je Spur 1,3,5,7) oder in Tris-HCl Puffer pH 7,0 (je Spur 2,4,6,8) durchgeführt. Sie wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mit Bioimaging dargestellt.

#### 4.7. Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE

Nachdem in den Extrakten aus transformierter Hefe oder Bakterien keine 2-ODD-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression des Proteins mittels SDS-PAGE überprüft. In Fällen der Expression in Bakterien vom Vektor pDEST17 wurde ein Polypeptid von 40 kDa erwartet (errechnete Molekularmasse 37 kDa und Molekularmasse des His-Tags 3 kDa). Im Falle der Hefe ist der His-Tag des Vektors pYES-DEST52 (4 kDa) geringfügig größer. Die Auswertung der Induktionsversuche über SDS-PAGE (Abbildung 42) lässt einen deutlich induzierten Anstieg der Intensität einer Polypeptid-Bande von etwa 40 kDa in den Proben der induzierten Bakterienkultur erkennen. Diese Polypeptid-Bande kann auch, wenn auch reduziert, in den Rohextrakten wiedergefunden werden. Jedoch lässt sich ohne Nachweis der Enzymaktivität die Identität der klonierten cDNA als FLS wie auch im Fall der *Ea*ODD1 nicht beweisen.



**Abbildung 42**

Nachweis der Expression von rekombinanter *Ea*ODD2.

Abwechselnd aufgetragene, induzierte und nicht induzierte *Ea*ODD2\_pDEST17 Bakterienkultur nach 0, 2½ und 5 h (Spur 1-6) sowie die Rohextrakte der induzierten *Ea*ODD2\_pDEST17 Bakterienkultur (Spur 7) und der induzierten *Ea*ODD2\_pYES-DEST52 Hefekultur (Spur 8) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion gefärbt. Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg.

## 5. Sequenzanalyse

### 5.1. Vergleich der cDNA-Sequenzen *Ea*ODD1 und *Ea*ODD2

Die Sequenz-Homologie von *Ea*ODD1 und *Ea*ODD2 untereinander wurde mit Hilfe der im Internet verfügbaren Alignment-Funktion <http://align.genome.jp/> analysiert. Dabei wurde eine gegenseitige Identität von nur 17 % berechnet. Diese geringe Übereinstimmung ist erstaunlich, da für verschiedene pflanzliche Dioxygenasen eine allgemeine Sequenzidentität von 30-40 % nachgewiesen wurde (Prescott und John, 1996).

### 5.2. Konservierte Aminosäuren in 2-ODDn

Das Alignment der beiden aus Ackerschachtelhalm klonierten Sequenzen und der FLS aus *Petersilie* lässt die konservierten bzw. streng konservierten Aminosäuren erkennen (Abbildung 43). Gelb gefärbte Aminosäuren sind mit hoher Wahrscheinlichkeit für die richtige Faltung des Proteins wichtig. Grün und violett gekennzeichnete Aminosäuren finden sich im aktiven Zentrum des Proteins wieder. Dabei dient das HxD-Motiv mit dem zusätzlichen Histidin (grün markiert) der Koordination des Eisen(II)ions, während das RxS-Motiv (violett) für die Bindung des Kofaktors 2-Oxoglutarat essentiell ist. Auch die blau markierten Aminosäuren sind in allen 2-ODDn strikt konserviert, konnten jedoch bislang keiner Funktion zugeordnet werden. Zudem wird das Phenylalanin am Ende des konservierten Bereiches, der auch das RxS-Motiv beinhaltet, zur Substratstabilisierung mittels  $\pi$ -Stacking benötigt (Britsch et al., 1993; Lukačín et al., 1997).

In der *Ea*ODD1 fällt auf, dass zwei sonst konservierte Aminosäuren mutiert sind. Dazu gehört zum einen ein an der Faltung beteiligtes Alanin, hier Ile-71, das in *Ea*ODD2 völlig fehlt und die Faltung beeinflussen muss. Bei der anderen Aminosäure handelt es sich um Ala-302 (Position 324 des Alignments). Hier wurde in *Ea*ODD1 das sonst für das  $\pi$ -Stacking verantwortliche Phenylalanin ersetzt.



60

*Ea*ODD1 MAEVVAPTILKSIGDLSAVSFCSKEVDGFVIPNEFVLPESSRPSVPYDSFPFAPFELPVIDLS  
*Pc*FLS -----MEVERVQAISKMSRCMD--TIPSEYIRSESEQPAVTTMQGVVLQVPVIDLG  
*Ea*ODD2 ----MLPPFTSLPVIDVGPLVEKCS-----PNFEKNEDAMDVVRQIDFA  
                  .:   .:. .   .:   \*                                   \* .   .   :   \*\*.:.

120

*Ea*ODD1 ELDNAAK-----LTKICEEWGFFQVVNHGVAVKVLERMVEIGHDFFSLPTH-----EKEK  
*Pc*FLS SSNNTEENLVELIAEASREWGIFFQVVNHGIPDDAIAKLQKVGKEFFELPQQ-----EKEV  
*Ea*ODD2 CKD-----S--GFFYAIGHGVRESLVESVRNVSRDYFHQSFENKIQIKMSS  
                  :                                   \*.\*   .:.\*\*:   . :   :   :~::~\*   . .   :   .

180

*Ea*ODD1 GS----ISYMNGYGAKQINFGLG-TPWVEGLTFPILPESNIETFEARIWPLGNPHFRETI  
*Pc*FLS IAKPEGYQGVVEGYGTLKQKELGGKKGWVDHLFHIWPKSAVN---YNFWPNNPPLYREAN  
*Ea*ODD2 KTGYRGYQKVGENVTKGQPDLEAIDYYKELEPGQYGDLGAVMCAPNQWPQYPPEFQSQVM  
                  :   . :   :\*                                   : . \*   .   .   . \*\*   \* :~::.

240

*Ea*ODD1 YEFARELESLEDTVLQLLAMGLGLESPDFFSKHLKSGSTTKGVHFNYYPPCP-----D  
*Pc*FLS EEYAVALRGVVDKLFEALSLGIGLEKHELKKASG-GDDLIYMLKINYYPPCP-----R  
*Ea*ODD2 EEYIEVMLGLSRKLMRGIALALGGSS--DSFEGEKAGDPFWVMRVIYYPHPHTVKDNSSSD  
                  \*:   :   .:   :~::   :~::~\*   . .   :   .   .   . :~::~\*\*

300

*Ea*ODD1 PSKVLGALPHTDPSLLTVLFQD-KVSGLQIMAKDGTWLTVQHKPNGLLFFVGDIMQGSWN  
*Pc*FLS PDLALGVVAHTDMSAITILVPN-EVQGLQVHKDD-HWYDVKYIPNALIIHIGDQIEIMSN  
*Ea*ODD2 EDNGVGCGAHTDYGLLTLVNQDPDLCALQVKNQSGDWINAIIPVKGAFFVNVIGDMLKIWSN  
                  .   :\*   .\*\*\*   . :~::~   :   .:   .\*\*:   . .   \*   .   .~::~:~::~\*\*   :~::~\*\*

360

*Ea*ODD1 NRFPVAVIHRVALNKKIPRLSFLHATNPPKDLILEPSPNLVDD-EHPLLYKPFTYSGYMKF  
*Pc*FLS GKYSVYHRTTVNKDKTRMSWPVFLEPPPELLTGPISKLITD-ENPAKFKTKKYKDYVYC  
*Ea*ODD2 GLYQSTLHRVINNNPKYRVSVVPFFLEPNFDVVVEPLESCKMKSANNGETKPVVYGEHLVK  
                  . :   .:   \*\*   .~::~   \*~::~\*   :~::~\*   :~::~\*   .   .   :   .   \*   \*   :~::~

393

*Ea*ODD1 KSHLHVQRPYDAKPIDVYAGLANTHNIPCEDPH  
*Pc*FLS KLNKLPQ-----  
*Ea*ODD2 KVLTNFY-----  
                  \*

### Abbildung 43

Alignment von *Ea*ODD1 und *Ea*ODD2 mit FLS aus *P. crispum*.

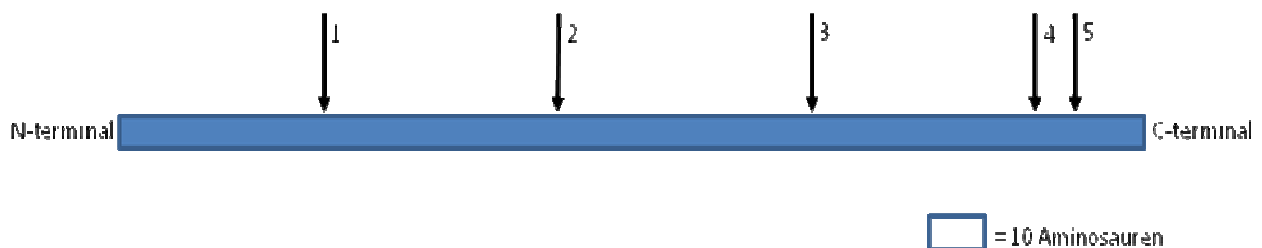
Unterstrichene Abschnitte geben konservierte Bereiche an.

Farbig markierte Aminosäuren entsprechen konservierten Aminosäuren: Gelb = Aminosäuren, die für eine richtige Faltung wichtig sind; Grün = Aminosäuren (HxD-Motiv + H) zur Komplexierung des Eisen-II-Ions im aktiven Zentrum; Violett = RxS-Motiv zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats in der Bindetasche; Blau = Aminosäuren, deren Funktion noch nicht bekannt ist

### 5.3. gDNA-Sequenzvergleiche

Zum weiteren Vergleich mit anderen Dioxygenasen wurde die genomische Sequenz der 2-ODD1 aus Ackerschachtelhalm ermittelt (Abbildung 44). Allgemein ist die Insertion in vier Positionen von 2-ODD-Genen bekannt. Dabei sind Anzahl und Position der Introns für eine Untergruppe mit gemeinsamer katalytischer Funktion spezifisch. Im Rahmen der Flavonoidbiosynthese folgen die 2-ODD-Gene dem Muster mit zwei Introns in den Positionen 2 und 4 für FNS I, zwei Introns in den Positionen 3 und 4 für FLS, ein Intron in Position 3 für ANS. Gene, die für FHT kodieren, besitzen hingegen keine Introns (Prescott und John, 1996; Gebhardt et al., 2005).

Die gDNA-Sequenz der *Ea*ODD1 weist drei Introns auf, von denen zwei in den für Dioxygenasen typischen Positionen 3 und 4 lokalisiert sind. Dies entspricht auch vage der Annahme, dass es sich bei der klonierten Sequenz um eine putative FLS-cDNA handelt. Zusätzlich befindet sich ein weiteres Intron (Position Nr. 5) downstream von Position 4, das von der typischen Intronstruktur der 2-ODDn abweicht.



**Abbildung 44**

Schematische Darstellung der Intron-/Exon-Struktur in Anlehnung an Prescott und John (1996)  
 Die nummerierten Pfeile stellen die möglichen Intronpositionen im Gen dar, wobei die Positionen 1-4 den bekannten Intronpositionen der 2-ODDn entsprechen.  
 Die Position 5 stellt ein zusätzliches 3. Intron des Gens der 2-ODD1 aus *E. arvense* neben Introns in den Positionen 3 und 4 dar.

#### 5.4. Phylogenetische Analyse

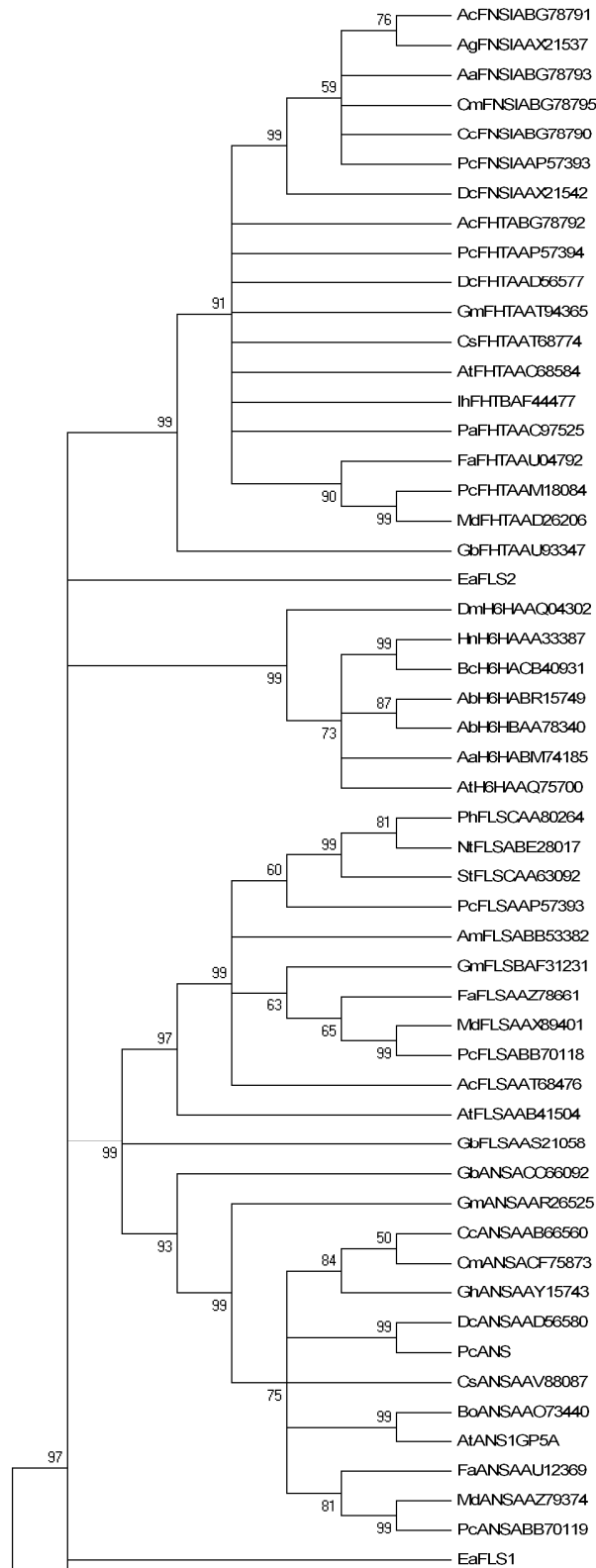
Zur weiteren Einordnung der 2-ODD-Sequenzen aus *E. arvense* wurde ein phylogenetischer Stammbaum für 2-ODDn mit dem Programm MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007) nach paarweisen Alignments mittels der Neighbor-Joining-Methode mit 1000 Wiederholungen erstellt. Verwendet wurden neben den Polypeptid-Sequenzen der vier 2-ODDn aus der Flavonoidbiosynthese auch entfernte 2-ODD-Sequenzen (Abbildung 45). Die Analyse zeigte, dass die Sequenzen der 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese bis auf eine Ausnahme einen Seitenast des Phylogeniebaumes bilden und dort in weitere Cluster nach ihrer Funktion unterteilt sind (Gebhardt et al., 2005). Auch alle anderen 2-ODD-Sequenzen bilden ihrer katalytischen Funktion entsprechend unterteilte Cluster.

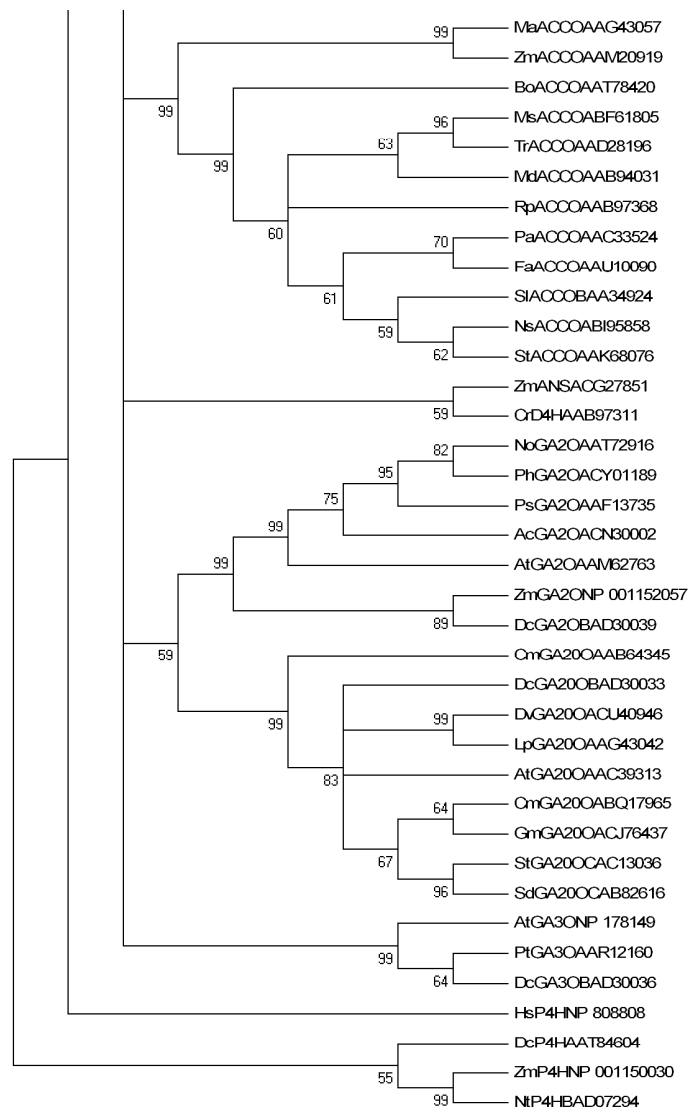
Diese Zuordnung wird nur von der ANS-Sequenz aus Mais unterbrochen. Diese Sequenz wurde nicht dem Cluster der ANS-Sequenzen zugeordnet, sondern weist eine geringe Identität zum einzigen Vertreter der Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylasen (D4H aus *Catharanthus roseus* (CrD4H)) auf.

Als Outgroup wurde eine Prolyl 4-Hydroxylase (P4H) aus *Homo sapiens* gewählt. Obwohl dieses Enzym die gleiche katalytische Funktion wie pflanzliche P4H aufweist, ist eine deutliche Abgrenzung zwischen pflanzlichen und tierischen Polypeptid-Sequenzen zu erwarten und konnte im Stammbaum bestätigt werden.

Beide ODD-Polypeptide aus *E. arvense* konnten keinem Cluster und damit keiner Enzymgruppe mit einer bestimmten katalytischen Funktion zugeordnet werden. Somit ließ sich für diese Sequenzen auch mit dieser Analyse keine Aussage über eine mögliche katalytische Aktivität herleiten.

Im Weiteren war festzustellen, dass die Sequenzeinteilung innerhalb einer Enzymuntergruppe weitgehend der taxonomischen Anordnung (NCBI taxonomy database) der entsprechenden Pflanzen entsprachen.



**Abbildung 45**

Phylogenie-Baum:

ACCO, Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Oxidase; GA200, Gibberellin 20-Oxidase; GA30, Gibberellin 3beta-Hydroxylase; GA2O, Gibberellin 2beta-Hydroxylase; H6H, Hyoscyamin 6beta-Hydroxylase; D4H, Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase; P4H, Prolyl-4-Hydroxylase

HsP4HNP = Außengruppe

Accession-No.: siehe Anhang

## V. Ergebnisse – *P. crispum*

### 1. Stressexperimente

#### 1.1. Physiologie

Petersilienpflanzen wurden unter unterschiedlichen Stressbedingungen kultiviert. In diesen Versuchen war die Rotfärbung der Stängel unter Trockenstress (Abbildung 46) besonders auffällig. Die Färbung begann am unteren Ende des Stängels und zog sich je nach Intensität des Stresses weiter nach oben. Durch Starklichtbestrahlung und Stickstoffunterversorgung konnte die Rotfärbung verstärkt, jedoch nicht ausgelöst werden. Andere Bedingungen zur Auslösung von Stress zeigten hinsichtlich der Anreicherung von roten Substanzen in der Pflanze keinen Effekt.

Analoge Versuche wurden mit Petersilienzellkulturen durchgeführt, blieben in Hinblick auf die Bildung roter Pigmente jedoch erfolglos.



**Abbildung 46**

- (A) Petersilie ohne rote Inhaltsstoffe (ungestresst)
- (B) Petersilie mit roten Inhaltsstoffen (gestresst)

## 1.2. Inhaltsstoffe

Für die erste Inhaltsstoffanalyse wurden rote und grüne Petersilienstängel fein gemörsert und mit Methanol bzw. Methanol/HCl extrahiert. Jeweils die Hälfte des Extraktes wurde hydrolysiert (III.8.1.). Von den hydrolysierten und nicht hydrolysierten Extrakten wurden die Spektren im Bereich von 400 bis 800 nm vermessen. Auf diese Weise konnte in Extrakten aus Pflanzen nach Trockenstress ein neues Absorptionsmaximum im Bereich von 530 nm detektiert werden (Abbildung 47). Diese Absorption liegt im Bereich von 465-560 nm, der dem Absorptionsmaximum für Anthocyane und Anthocyanidine entspricht.

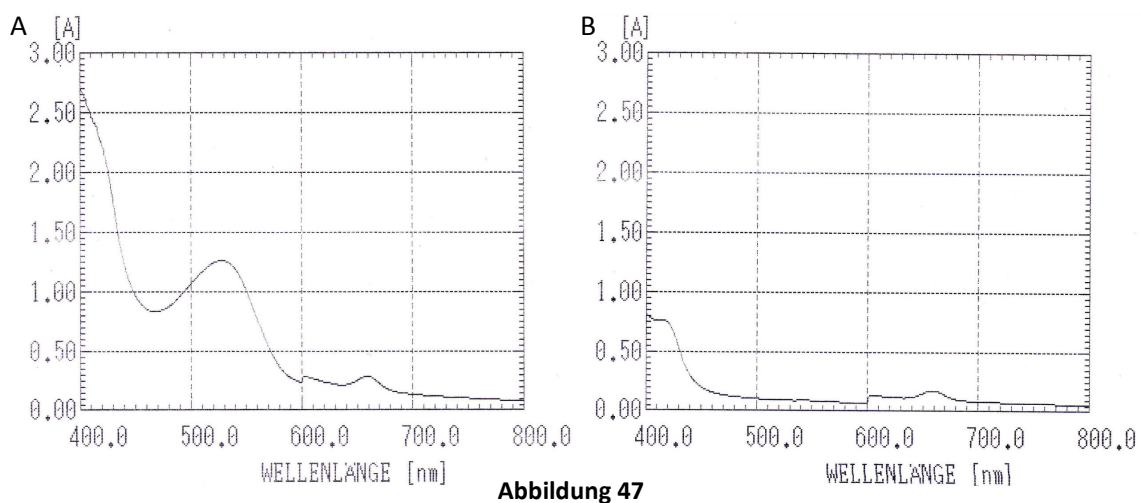
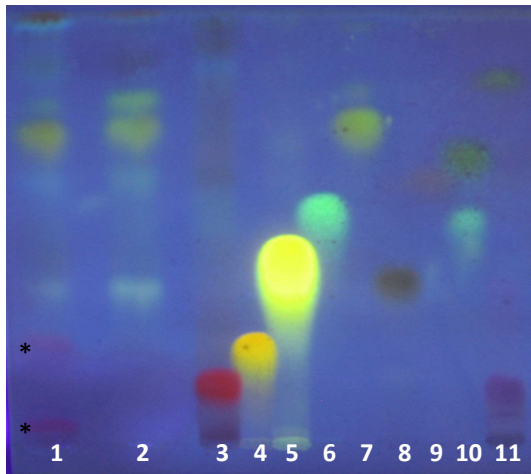


Abbildung 47  
Absorption der Extrakte aus gestressten (A) und ungestressten (B) Petersilienpflanzen.

Die Extrakte wurden mittels DC und UPLC-MS auf den Gehalt an Anthocyanen und Anthocyanidinen bzw. anderen Flavonoiden analysiert (III.8.2.; III.8.4.). In nativen Extrakten von sowohl stressfrei als auch unter Stress kultivierter Petersilie konnte Ap nachgewiesen werden, das schon lange als Inhaltsstoff der Petersilie bekannt ist (Abbildung 48). Mit dem Naturstoff-Reagenz A konnten weitere Banden deutlich angefärbt werden, welche auf weitere Flavonoide hindeuten. Diese sind in beiden Extrakten nahezu gleich nachweisbar. Lediglich zwei rote bzw. rot-violette Flecke lassen sich nur im Extrakt der unter Stressbedingungen kultivierten Pflanze finden. Sie weisen unter diesen Trennungsbedingungen ein Laufverhalten auf, das dem der Anthocyane entspricht. In den anschließenden Versuchen mit verschiedenen Referenzen konnten die roten Farbstoffe zunächst keiner Substanz zugeordnet werden.

**Abbildung 48**

Flavonoid-Muster in Extrakten gestresster und ungestresster Petersilie.

Die Substanzen wurden durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt, zur Detektion mit Naturstoffreagenz A besprüht und anschl. unter UV-Licht betrachtet.

Zusätzliche rote Spots des Extraktes gestresster Pflanze sind mit \* markiert.

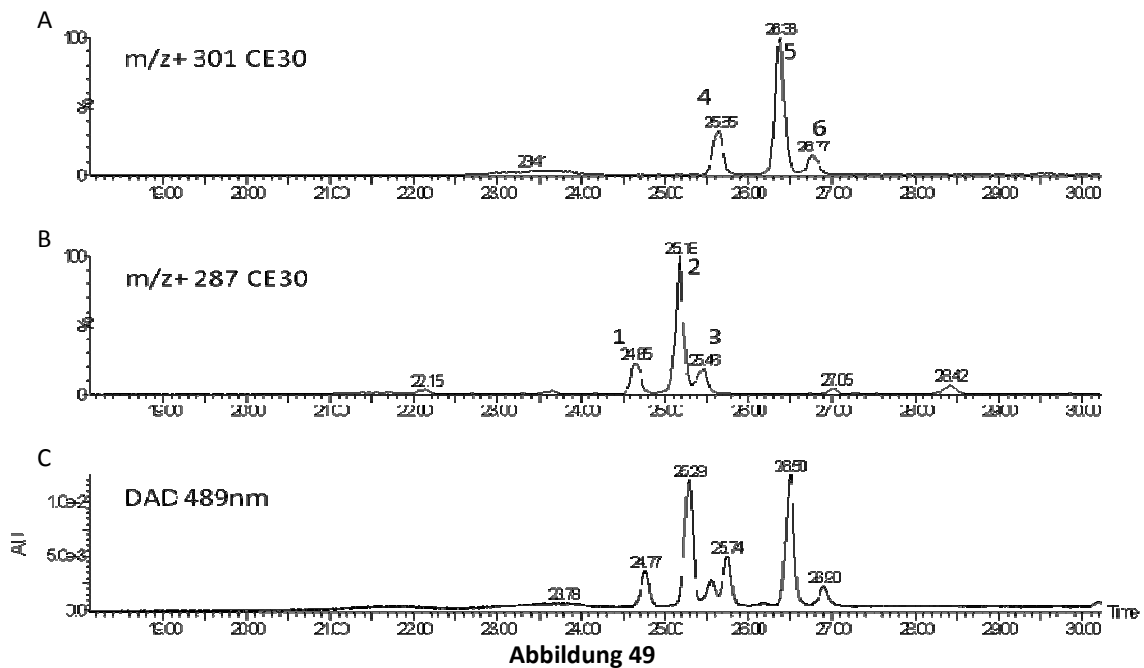
1 = Roter Extrakt; 2 = Grüner Extrakt; 3 = Cy; 4 = Qu;

5 = Lu; 6 = Km; 7 = Ap; 8 = DHQ; 9 = ERI; 10 = DHK;

11 = NAR (oben) + Pg (unten)

Aus dem hydrolysierten Extrakt konnte das Anthocyanidin nicht in einer für die DC-Analytik ausreichenden Menge angereichert werden. Aus diesem Grund wurden die Extrakte mittels UPLC-MS aufgetrennt und die Trennung bei 489 nm verfolgt, einer Wellenlänge, die dem Bereich des Absorptionsmaximums von Anthocyanidinen (465-560 nm) entspricht. Sowohl im hydrolysierten als auch im nicht hydrolysierten Extrakt konnten in der UPLC-MS-Analyse sechs rote Substanzen detektiert werden, die mittels Massenspektroskopie (MS) weiter analysiert wurden. In der Massenanalyse der Substanzen 1-3 konnte ein Molekulargewicht von 287 (entsprechend Cyanidin), bei der Analyse der Metabolite 4-6 ein Molekulargewicht von 301 (entsprechend Paeonidin) nachgewiesen werden. Mit den Ergebnissen der LC-MS-Analyse konnten somit je drei Glykoside der beiden Aglyka Cyanidin und Paeonidin nachgewiesen werden (Abbildung 49). Die Positionen und die Art der Glykosylierungen konnte aufgrund der starken Mehrfachglykosylierung nicht ermittelt werden. Sowohl im hydrolysierten als auch im nicht hydrolysierten Extrakt wurden die gleichen Massen zu gleichen Retentionszeiten nachgewiesen. Dies bedeutet, dass in beiden Extrakten dieselben Substanzen nachgewiesen wurden und folglich die Hydrolyse zum einen nur unvollständig durchgeführt wurde bzw. zum anderen die Aglyka unter Hydrolysebedingungen instabil waren.





LC-MS-Analytik des roten Petersilienextraktes.

Die Auftrennung der Metaboliten im Extrakt der roten Petersilie mittels LC wurde durch Absorption bei 489 nm verfolgt (C) und die aufgetretenen Fragmente m/z 301 (A) bzw. m/z 287 (B) durch inline MS zugeordnet.

## 2. Klonierung und Expression einer putativen ANS aus *Petroselinum crispum* (PcANS)

### 2.1. Klonierung

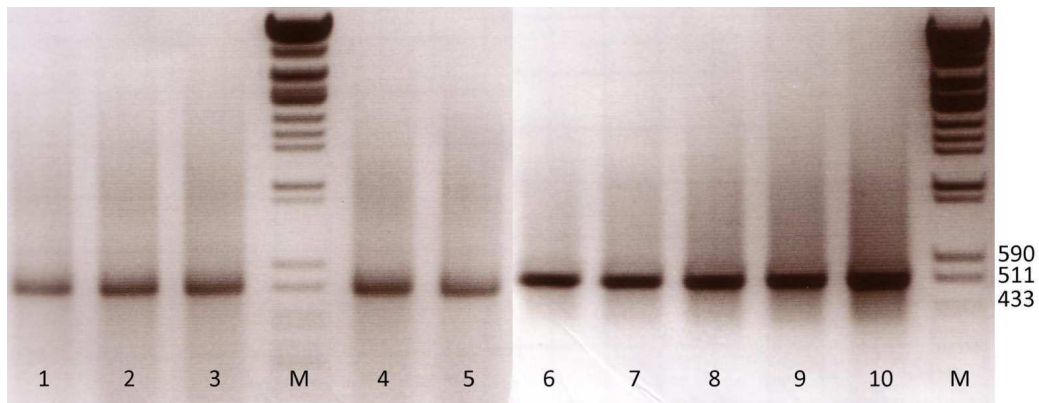
Da Anthocyane als Inhaltsstoffe des roten Petersilienextraktes bestätigt werden konnten, wurde mittels RT-PCR eine ANS cDNA aus Petersilie kloniert. Dazu wurde die Gesamt-RNA der gestressten Pflanze isoliert und für die PCR in cDNA als Template überschrieben. Die PCR-Amplifikation unter Standardbedingung erfolgte mit den degenerierten forward-Primern ANS 3.1 und ANS 3.2, die aus Vergleichen der 3'-Enden verschiedener ANS-Sequenzen entwickelt worden waren, gegen oligo-dT-Anchor- bzw. PCR-Anchor-Primer (siehe Anhang). Das Amplicon wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C (Abbildung 50) in den Klonierungsvektor pCR2.1 eingebracht und sequenziert.

**Abbildung 50**

Nested-PCR-Amplifizierung einer cDNA-Teilsequenz aus *P. crispum* mit ANS-spezifischen Oligonucleotid-Primern. Als Template wurde das erste PCR-Produkt der Primer ANS3.1 und Oligo-dT-Anchor über *Pc* Gesamt-cDNA verwendet. Es wurden die Primer ANS3.2 und PCR-Anchor eingesetzt und mit einer Anlagerungstemperatur von 50 °C (1), 53 °C (2), 55 °C (3), 58 °C (4) und 60 °C (5) amplifiziert. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung lokalisiert.

Das Amplicon von 656 bp Länge zeigte 89 % Identität zu ANS aus *Daucus carota*. Davon ausgehend wurden genspezifische 5'-RACE-Primer, *PcANS\_5.1*, *PcANS\_5.2* und *PcANS\_5.3*, entwickelt und mittels 5'-RACE-PCR das 5'-Ende amplifiziert. Obwohl nur schwache Banden und unsaubere PCR-Produkte erhalten wurden, wurden diese PCR-Produkte der A-tailed und C-tailed cDNA in den Vektor pCR2.1 TOPO TA ligiert. Nach der Sequenzierung konnte eine Sequenz von 954 bp einer ANS-Sequenz zugeordnet und mit dem 3'-Ende zusammengesetzt werden. Die daraus resultierende cDNA wies eine Länge von 1359 bp auf.

Die Sequenzanalyse mit dem Programm BlastX bestätigte eine hohe Identität von ca. 90 % zur ANS aus *D. carota*. Ein Alignment zeigte, dass die Petersiliensequenz im Vergleich zur ANS aus Möhre einen Einschub von 202 bp enthielt, durch den auch das angenommene Leseraster unterbrochen wurde. Zudem konnte in dieser Sequenz kein Start-Codon mit zugehörigem offenem Leserahmen gefunden werden. Aus diesem Grund wurden die Sequenzierungsplots genauer untersucht und daraus abgelesen, dass nicht die Amplifizierung zu früh abbrach, sondern das Tailing des 5'-RACE an eine verkürzte cDNA angehängt worden war, die somit nur partiell amplifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden, ausgehend von der neu zusammengesetzten Sequenz, erneut 5'-RACE-Primer (*PcANS\_5.6*, *PcANS\_5.7* und *PcANS\_5.8*) hergestellt, mit denen ein zweites 5'-RACE durchgeführt wurde (Abbildung 51).

**Abbildung 51**

Nested-PCR-Amplifizierung des ANS cDNA-5'-Endes aus *P. crispum* mit ANS-spezifischen Oligonucleotid-Primern.

Als Template wurde das PCR-Produkt der Primer ANS\_5.7 und oligo-dT-Anchor (A-tailed cDNA, Spur 6-10) bzw. AA-Primer (C-tailed cDNA, Spur 1-5) über genspezifische *Pc* cDNA verwendet. Es wurden die Primer ANS\_5.8 und PCR-Anchor (Spur 6-10) bzw. AUA-Primer (Spur 1-5) eingesetzt und bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C (1,6), 53 °C (2,7), 55 °C (3,8), 58 °C (4,9) oder 60 °C (5,10) amplifiziert. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung lokalisiert.

Es wurde jeweils das PCR-Produkt mit einer Anlagerungstemperatur von 55 °C in pCR2.1 TOPO TA ligiert.

Die nested-PCR wurde in beiden Fällen unter Standardbedingungen bei 50-60 °C durchgeführt. Die jeweils bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C amplifizierten PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1 TOPO TA ligiert, das Plasmid in *E. coli* eingebracht und sequenziert. Mit der erhaltenen Sequenz von 410 bp konnte anhand der überlappenden Bereiche die bereits bekannte Sequenz vervollständigt werden. In der nun erhaltenen Gesamtsequenz von 1459 bp konnte ein Start-Codon, analog zur ANS aus *D. carota*, identifiziert werden. Jedoch enthielt die zusammengesetzte Sequenz noch immer einen Einschub. Die kodierende Sequenz upstream des Einschubs wies auf Polypeptid-Ebene eine Identität von 88 % und die kodierende Sequenz downstream eine Identität von 91 % zur ANS aus *D. carota* auf.

Der von *DcANS* abweichende Sequenzbereich lässt sich durch Kontamination des ursprünglichen RNA-Templates mit genomischer DNA erklären, was apparent zu einem Einschub als Intron führt. Aus diesem Grund wurden die Bereiche des Start- und Stopp-Codons der zusammengesetzten Sequenz genutzt, um Vollängenprimer, *PcANSfullneu\_f* und *PcANSfull\_r* (mit Stopp-Codon) bzw. *PcANSohneStopp\_r* (ohne Stopp-Codon), zu entwickeln.

In PCR-Amplifikationen mit der gesamten cDNA der unter Stressbedingungen kultivierten Petersilie konnten zwei Produkte ohne Stopp-Codon und ein Amplicon mit Stopp unter Standardbedingungen bei 55 °C detektiert werden (Abbildung 52). Die Analyse der Sequenzen zeigte ein offenes Leseraster und eine 90 %ige Identität zur ANS aus *D. carota* für die kürzere Sequenz ohne Stopp-Codon und die Sequenz mit Stopp-Codon von 1284 bp Länge. Die längere Sequenz ohne Stopp-Codon stimmte mit der mittels RACE zusammengesetzten Sequenz überein. Dies bestätigte die Annahme, dass die verwendete cDNA durch unsaubere mRNA-Isolation mit gDNA verunreinigt war. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der kürzeren Sequenz um die korrekte cDNA einer kodierenden Sequenz einer putativen ANS aus Petersilie handelt.



**Abbildung 52**

PCR-Amplifizierung der vollständigen cDNA aus Petersilie mit ANS-spezifischen Primern.

Als Template wurde die *Pc* Gesamt-cDNA verwendet und das PCR-Produkt mit den Primern *PcANSfullneu\_f* und *PcANSfull\_r* für Amplifikate mit Stopp-Codon (MS) bzw. *PcANSohneStop\_r* für Amplifikate ohne Stopp-Codon (OS) unter Standardbedingungen bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C amplifiziert. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid unter UV-Beleuchtung lokalisiert.

Die korrekten cDNA-Sequenzen mit und ohne Stopp-Codon wurden in die Klonierungsvektoren pCR2.1 TOPO TA und pCR8 GW/TOPO TA und die Sequenz ohne Stopp-Codon zusätzlich in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1 TOPO TA (*PcANS\_pYES2.1*) eingebracht. Von dem Klonierungsvektor pCR2.1 ausgehend wurde die ANS-Sequenz mit Stopp-Codon in die Bakterienexpressionsvektoren pET15b (*PcANS\_pET15b*), pETDuet-1 und pQE70 (*PcANS\_pQE70*) sowie in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (*PcANS\_pYES2*) ligiert. Zusätzlich wurde die ANS-Sequenz aus Petersilie mit Stopp-Codon aus Vektor pCR8 in die Bakterienexpressionsvektoren pDEST17 (*PcANS\_pDEST17*) und pDEST 14 (*PcANS\_pDEST14*), sowie ohne Stopp-Codon in den Hefeexpressionsvektor pYES-DEST52 (*PcANS\_pYES-DEST52*) umkloniert.

Die Besonderheit des pETDuet-1 Vektors liegt darin, dass zwei multiple Klonierungsbereiche auf dem Vektor liegen, die durch denselben Promotor kontrolliert werden (IX.3.7.). Dadurch können zwei Sequenzen in diesen Vektor kloniert werden, die dann gleichzeitig exprimiert werden. Das kann genutzt werden, um das labile Substrat der ANS *in situ* zu erzeugen. Als erstes Insert wurde die bereits bekannte cDNA-Sequenz der DFR aus *Callistephus chinensis* und als zweite Sequenz die hier zu untersuchende ANS-cDNA-Sequenz aus Petersilie in den Vektor gebracht (CcDFR\_PcANS\_pETDuet-1). Damit sind die Voraussetzungen für die Biotransformation des stabilen Dihydroflavonols als Substrat geschaffen, das über das instabile Leukoanthocyanidin direkt zum Anthocyanidin umgesetzt wird. Ebenso ist die gleichzeitige Expression und Isolierung beider Enzyme für *in vitro* Untersuchungen möglich.

## 2.2. Expression in Bakterien

Zur Expression wurden Bakterien des BL21 (DE3)-Stammes mit den Plasmiden PcANS\_pET15b bzw. CcDFR\_PcANS\_pETDuet-1 transformiert. Die Plasmide PcANS\_pDEST17 und PcANS\_pDEST14 wurden zur Expression in BL21 A1-Zellen und PcANS\_pQE70 in M15[pREP4]-Bakterien überführt.

Kulturen mit Plasmiden des Gateway-Systems wurden bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 mit Arabinose induziert. Die übrigen Kulturen wurden nach Herstellerangaben bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 mit IPTG induziert (III.9.10.1). Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien abzentrifugiert, aufgeschlossen und der Proteinrohextrakt auf Enzymaktivität überprüft. Mit His-Tag exprimierte Proteine aus den Vektoren pET15b und pDEST17 wurden zusätzlich aus dem Rohextrakt über Ni-NTA-Agarose gereinigt (III.10.9.1), in Metallionen-freie Puffer überführt und auf Enzymaktivität getestet. Parallel wurde die DFR aus *C. chinensis* in Hefezellen exprimiert und der Rohextrakt zur Umsetzung von radioaktiv markiertem DHK zu LPg genutzt, um im Anschluss die Extrakte der induzierten rekombinanten Bakterien auf ANS-Aktivität zu testen. Mit keinem der Proteinextrakte konnte ein Umsatz von LPg zu Pg oder die Umsetzung von DHK zu Km als mögliche Nebenreaktion nachgewiesen werden (Abbildung 53). Spur 9 weist ein „Tailing“ des LPgs auf.

Dies ließ zunächst einen Umsatz zu Pg vermuten. Diese vermeintliche Aktivität konnte jedoch in mehrfachen Wiederholungsversuchen nicht bestätigt werden.

Enzymtests mit Extrakten aus pETDuet-1-Transformationen wurden zunächst mit NADPH unter Bedingungen für die DFR-Aktivität inkubiert, nach 30 min die Kofaktoren für 2-ODD-Aktivität zugegeben und weiter inkubiert. Auch hier konnte kein Umsatz nachgewiesen werden.

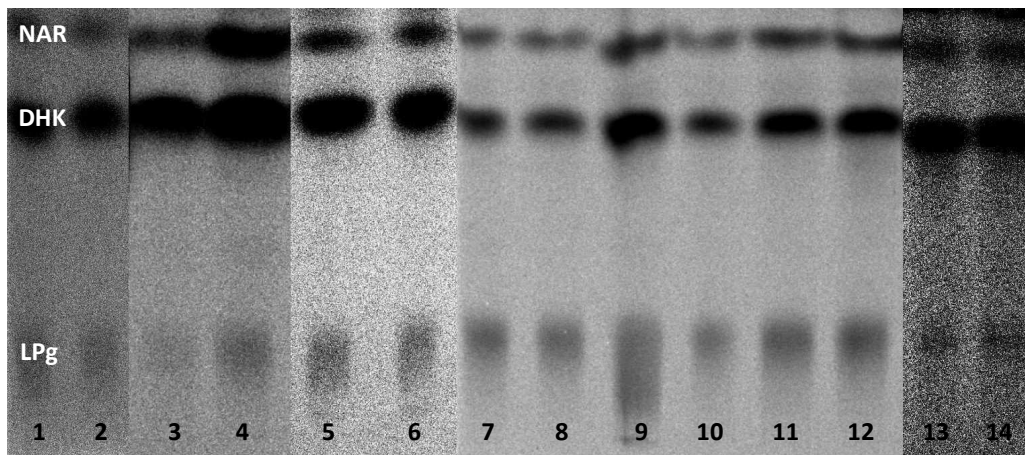


Abbildung 53

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität rekombinanter *PcANS*.

Der Proteinrohextrakt induzierter, *PcANS*\_pDEST14 (Spur 1+2), *PcANS*\_pDEST17 (Spur 3+4), *PcANS*\_pET15b (Spur 7+8), *PcANS*\_pQE70 (Spur 11+12) oder *CcDFR*\_PcANS\_pETDuet-1 (Spur 13+14) transformierter *E. coli*-Zellen bzw. Ni-NTA-gereinigte Proteinextrakte aus induzierten, *PcANS*\_pDEST17 (Spur 5+6) und *PcANS*\_pET15b (Spur 9+10) transformierten *E. coli*-Zellen wurden für Enzymtests verwendet.

Die Aktivität wurde unter Standardbedingungen in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Spur 1,3,5,7,9,11,13) oder Tris-HCl Puffer pH 7,0 (Spur 2,4,6,8,10,12,14) mit [ $^{14}$ C]DHK als Substrat und gekoppelter DFR-Reaktion gemessen. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mit Bioimaging detektiert.

Zudem wurden die Transformanten zu Biotransformationen (III.10.5) mit NAR, DHK, DHQ, LPg und LCy als Substrate eingesetzt. Jeweils 0, 5, 17 und 24 h nach Substratzugabe wurden Proben der Kultur gezogen und nach Extraktion mit Ethylacetat auf Cellulose-DC in CAW analysiert. Ein Umsatz von Dihydroflavonolen zu Flavonolen konnte mit Kulturen, die mit rekombinanten pDEST14 oder pQE70 transformiert waren, ab 17 h nach Zugabe des Substrats detektiert werden (Abbildung 54A-C). In allen weiteren Expressionskulturen und mit anderen Substraten konnte kein Umsatz nachgewiesen werden.

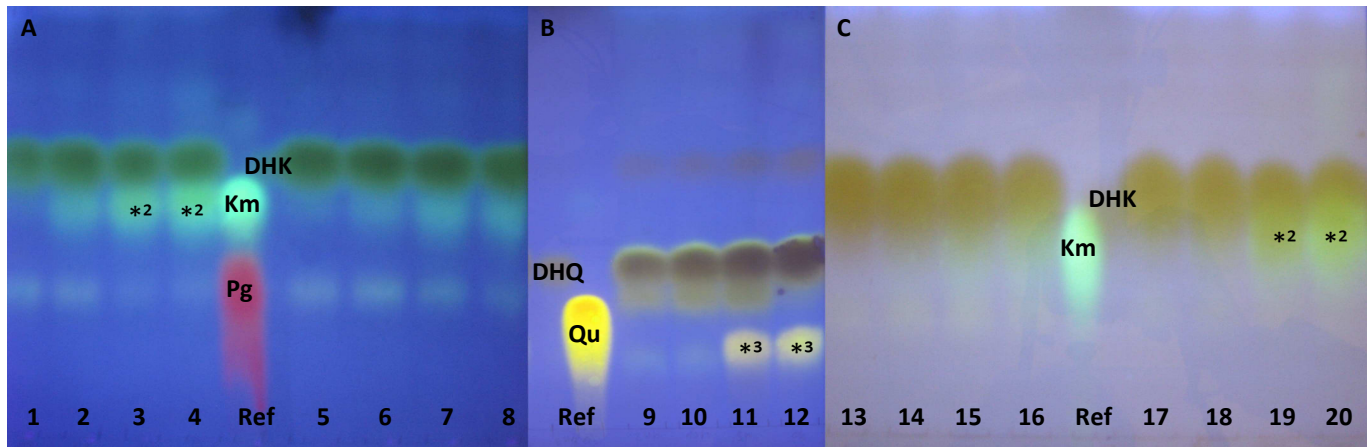


Abbildung 54

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität der Nebenreaktion rekombinanter PcANS.

In Biotransformationen mit Expressionskulturen *PcANS\_pDEST14* (A, 1-4; B, 9-12) und *PcANS\_pQE70* (C, 17-20) transformierter Bakterienzellen bzw. Expressionskulturen mit dem Kontrollvektor *pDEST\_gus* (A, 5-8) und dem *pQE70*-Leervektor (C, 13-16) transformierter Bakterienzellen wurde DHK (A+C) bzw. DHQ (B) als Substrat eingesetzt. 0, 5, 17 und 24 h nach Substrat-Zugabe wurde jeweils eine Probe von 1 ml entnommen und mit Ethylacetat extrahiert, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die Flavonoide durch Ansprühen mit Naturstoffreagenz A und Betrachtung unter UV-Licht detektiert. Es ist ein deutlicher Umsatz zu Km (\*<sup>2</sup>) und zu Qu (\*<sup>3</sup>) erkennbar, der bei den Negativkontrollen mit Leervektoren nicht nachweisbar ist.

### 2.3. Expressionskontrolle

Rohextrakte induzierter *E. coli*, die mit *PcANS\_pDEST17* oder *PcANS\_pET15b* Konstrukten transformiert waren, bzw. Eluate nach Ni-NTA-Fraktionierung des Rohextraktes wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Anhängen eines His-Tags von 3 kDa sollte die errechnete Proteinmasse 51 kDa aus beiden Vektoren betragen.



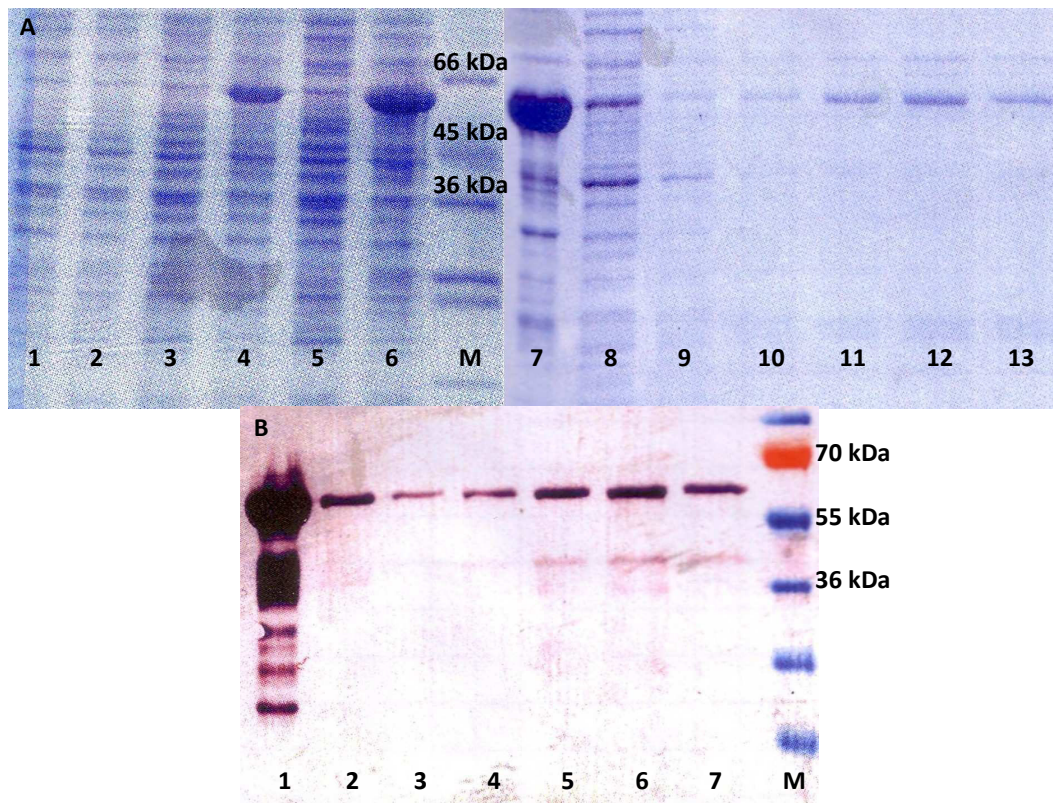


Abbildung 55

Kontrolle der Expression rekombinanter *PcANS* (pDEST17) in transformierten *E. coli* durch SDS-PAGE (A) und Western Blot (B).

Auf dem SDS-Gel (A) wurden zunächst alternierend die nicht induzierte (1, 3, 5) und induzierte Bakterienexpressionskultur (2, 4, 6) 0, 1½ und 3 h nach der Induktion untersucht. In den weiteren Spuren wurden der Rückstand des Aufschlusses (7) und die Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie Durchlauf (8), Waschfraktion (9) und die Eluate 1-4 (10-13) aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden zur Detektion mit Coomassie-Lösung gefärbt.

Im Western-Blot (B) konnte mit Hilfe des AntiHis-Antikörpers exprimierte Proteine nachgewiesen werden.

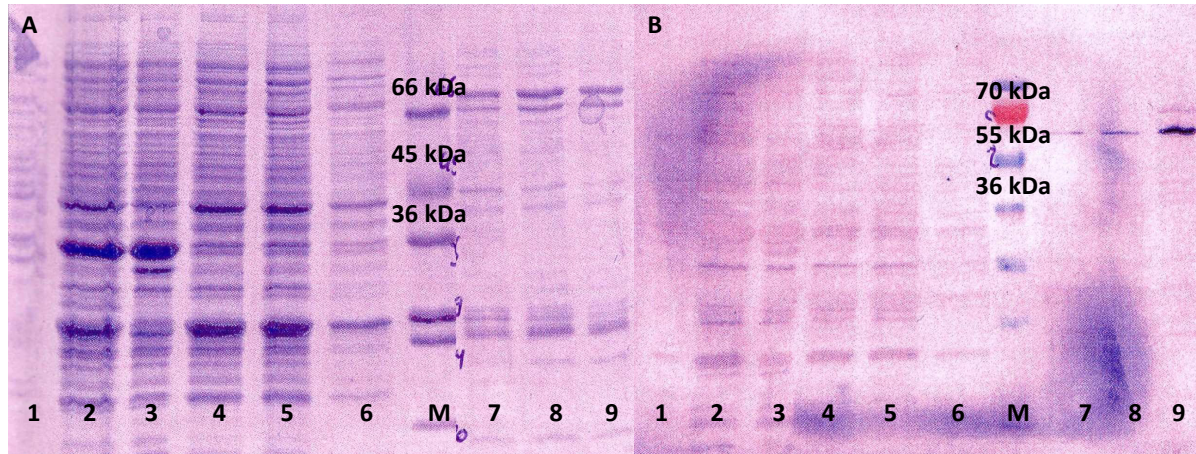
Hier wurden ebenfalls der Rückstand des Aufschlusses (1) und die Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie Durchlauf (2), Waschfraktion (3) und die Eluate 1-4 (4-7) aufgetrennt.

Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg mit Ausnahme der Expressionskultur (5 µl Kultur).

In der SDS-PAGE der Proteine aus induzierter *E. coli*-Kultur, die mit rekombinantem pDEST17 transformiert war, zeigte sich eine überexprimierte Polypeptid-Bande von ca. 55-60 kDa, die allerdings zu groß für das gesuchte Enzym war. Auch nach Fraktionierung des Rohextraktes über Ni-NTA-Agarose zeigte sich eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa (Abbildung 55A), die auch im Western-Blot mit AntiHis-Antikörper reagierte (Abbildung 55B).



Eine Proteinbande dieser Größe konnte in Extrakten und Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung der mit rekombinanten pET15b transformierten *E. coli*-Kulturen in der SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden (Abbildung 54A). Erst im Western-Blot mit AntiHis-Antikörper konnte die Bande eines zu großen Proteins bei ca. 60 kDa im Eluat der Ni-NTA-Aufreinigung detektiert werden (Abbildung 56B).



**Abbildung 56**

Expressionskontrolle rekombinanter PcANS (pET15b) in transformierten *E. coli* durch SDS-PAGE (A) und Western Blot (B).

Es wurden zunächst nicht induzierte (1) und induzierte Bakterienexpressionskultur (2) 3 h nach der Induktion untersucht. In den weiteren Spuren wurden der Rückstand (3) und der Rohextrakt (4) nach Aufschluss sowie die Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie Durchlauf (5), Waschfraktion (6) und die Eluate 1-3 (7-9) aufgetrennt.

Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion angefärbt (A) oder im Western Blot (B) mit AntiHis-Antikörper nachgewiesen. Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg mit Ausnahme der Expressionskultur (5 µl Kultur).

Die induzierte Expression eines Polypeptids mit His-Tag von 60 kDa kann z. Zt. nicht erklärt werden und entspricht jedenfalls nicht der gewünschten ANS. Die Expression des heterolog exprimierten Proteins in anderen Vektoren ohne His-Tag in Bakterien war zu gering, um eine weitere Aussage mittels SDS-Gel treffen zu können.

## 2.4. Expression in Hefe

Zur Expression von *PcANS* in Hefe wurden *INVSc1*-Hefezellen transformiert (III.9.10.2). Nach Induktion und Aufschluss wurden die Rohextrakte bzw. die Ni-NTA-Agarose gereinigter Fraktionen mit radioaktiv markiertem DHK auf Enzymaktivität getestet. Die Enzymtests wurden mit der DFR aus *C. chinensis* gekoppelt durchgeführt, um neben der Oxidation von DHK zu Km als ANS-Nebenreaktion auch die Umsetzung des instabilen Substrates LPg zu Pg zu überprüfen. In keinem der Enzymtests konnte DHK zu Km bzw. über LPg zu Pg umgesetzt werden (Abbildung 57).

Auch Versuche zu Biotransformationen von NAR, DHK und LPg lieferten keinen Umsatz (nicht gezeigt).

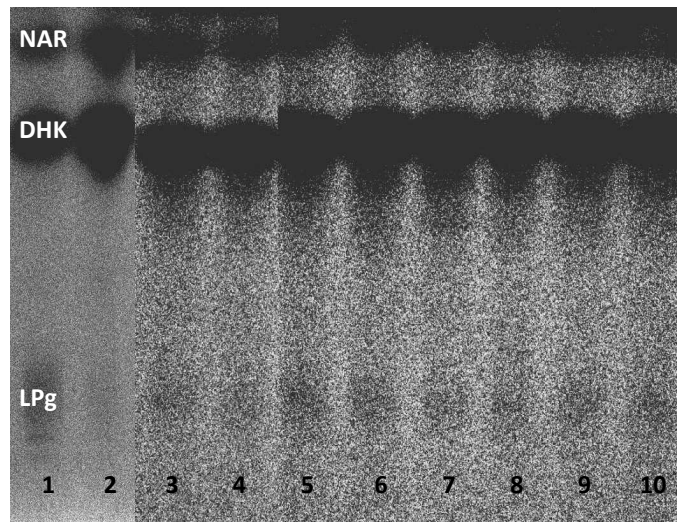


Abbildung 57

Versuche zum Nachweis enzymatischer Aktivität rekombinanter *PcANS*.

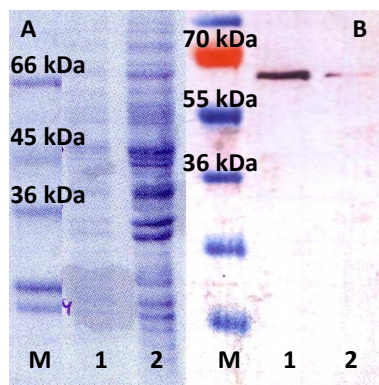
Der Proteinrohextrakt induzierter, *PcANS\_pYES2* (Spur 1+2), *PcANS\_pYES2.1* (Spur 3+4) und *PcANS\_pYES-DEST52* (Spur 5+6) transformierter *S. cerevisiae*-Zellen bzw. Ni-NTA-gereinigte Proteinextrakte aus induzierten, *PcANS\_pYES-DEST52* (Spur 7+8) und *PcANS\_pYES2.1* (Spur 9+10) transformierten *S. cerevisiae*-Zellen wurden für Enzymtests verwendet.

Die Aktivität wurde unter Standardbedingungen in Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (Spur 1,3,5,7,9) oder Tris-HCl Puffer pH 7,0 (Spur 2,4,6,8,10) mit [ $^{14}$ C]DHK als Substrat und gekoppelter DFR-Reaktion gemessen. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, die Extrakte durch Cellulose-DC in CAW aufgetrennt und die radioaktiven Verbindungen mit Bioimaging detektiert.

## 2.5. Expressionskontrolle

Die rekombinante Expression von Enzymen in Hefen kann wegen des hohen Proteingehaltes von Extrakten nicht direkt verfolgt werden, sondern erfordert eine Ni-NTA-Reinigung vor der SDS-PAGE oder die Analyse mittels Westernblot. Da kein AntiANS-Antikörper sondern nur ein AntiHis-Antikörper zur Verfügung stand, wurden die Expressionskontrollen auf mit His-Tag exprimierte Proteine beschränkt.

Die ANS-cDNA in pYES-DEST52 sollte wegen des größeren His-Tags im Vektor bei Expression zu einem Polypeptid von 52 kDa führen. Die Analyse der Hefezellen und des Rohextraktes aus Zellen mit Westernblot zeigte allerdings, wie im Falle der Bakterien, eine zu große Bande zwischen 55 und 70 kDa (Abbildung 58). Diese Bande ist damit etwa 10 kDa zu groß für die berechnete Größe des gesuchten Proteins.



**Abbildung 58**

Expressionskontrolle rekombinanter *PcANS* (pYES\_DEST52) in transformierten *S. cerevisiae* durch SDS-PAGE (A) und Western Blot (B). Die Expressionskultur (1) 16 h nach Induktion und der Proteinrohextrakt (2) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion angefärbt (A) oder im Western Blot (B) mit AntiHis-Antikörper nachgewiesen. Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg mit Ausnahme der Expressionskultur (5 µl Kultur)

Im Falle des pYES2.1-Vektors vergrößert der His-Tag die Proteinmasse um 5 kDa auf 53 kDa. Jedoch konnte auch hier nach Expression im Rohextrakt der Hefezellen nach SDS-PAGE bzw. Westernblotting nur eine verstärkte Bande bei etwa 62 kDa beobachtet werden (Abbildung 59). Es konnte somit keine eindeutige, rekombinante Expression der ANS aus Petersilie nachgewiesen werden.

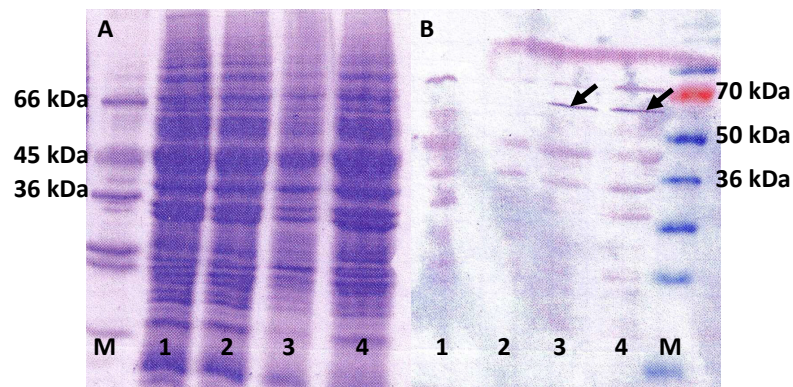


Abbildung 59

Expressionskontrolle rekombinanter *PcANS* (pYES2.1) in transformierten *S. cerevisiae* durch SDS-PAGE (A) und Western Blot (B).

Die Expressionskultur (1+2) 16 h nach Induktion und der Proteinrohextrakt (3+4) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Detektion angefärbt (A) oder im Western Blot (B) mit AntiHis-Antikörper nachgewiesen. Die Proteinmenge pro Spur betrug 10 µg (Spur 3) oder 20 µg (Spur 4) des Extrakt bzw. 5 µl (Spur 1) oder 10 µl (Spur 2) der Expressionskultur.

### 3. Expressionsanalyse im Pflanzengewebe

Aus Stängel- und Blattgewebe gestresster und nicht gestresster Petersilie wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und als Template jeweils mit Vollängen-Primern für PAL, 4-CL, CHS, FHT, FNS I, FLS, ANS oder 18S-RNA sowie mit degenerierten Primern für DFR-Sequenzen zur semi-quantitativen PCR über 15, 25 und 35 Zyklen eingesetzt. Die Agarose-Gelelektrophorese der Produkte (Abbildung 60A) zeigte mit 18S-RNA-Primern als Kontrolle in allen Ansätzen äquivalente Amplifikationen, was auf eine gleichmäßige und angemessene Konzentration von Primern und Templates in allen Ansätzen hindeutet. Wie in Abbildung 60 weiter zu erkennen ist die ANS-mRNA offensichtlich in allen Geweben etwa gleich stark exprimiert, wohingegen der mit degenerierten Primern für DFR-Sequenzen amplifizierte DNA-Abschnitt nur im Stängelgewebe gestresster Pflanzen nachgewiesen werden konnte. Die cDNA aller anderen Enzyme zeigt im gestressten Gewebe eine deutlich verminderte Expression im Vergleich zum Gewebe nicht gestresster Pflanzen. Nur das FHT Transkript konnte unter den verwendeten Bedingungen nachgewiesen werden, während PAL-, 4-CL-, CHS-, FNS I- und FLS-cDNA zunächst nicht aus gestresstem Gewebe

amplifiziert werden konnte. Erst die Erhöhung der Zyklen von 35 auf 40 lieferte auch mit Primern für die CHS-Sequenz ein Amplifikat (Abbildung 60B). Eine sichtbare Amplifikation mit FLS-Primern erforderte zusätzlich die Verdopplung der Primer-Menge im Reaktionsansatz, wohingegen auch nach Erhöhung der Primer- und Templatekonzentration sowie der Zyklenanzahl PAL-, 4CL- und FNS I-Sequenzen aus dem Gewebe gestresster Pflanzen nicht amplifiziert werden konnten.

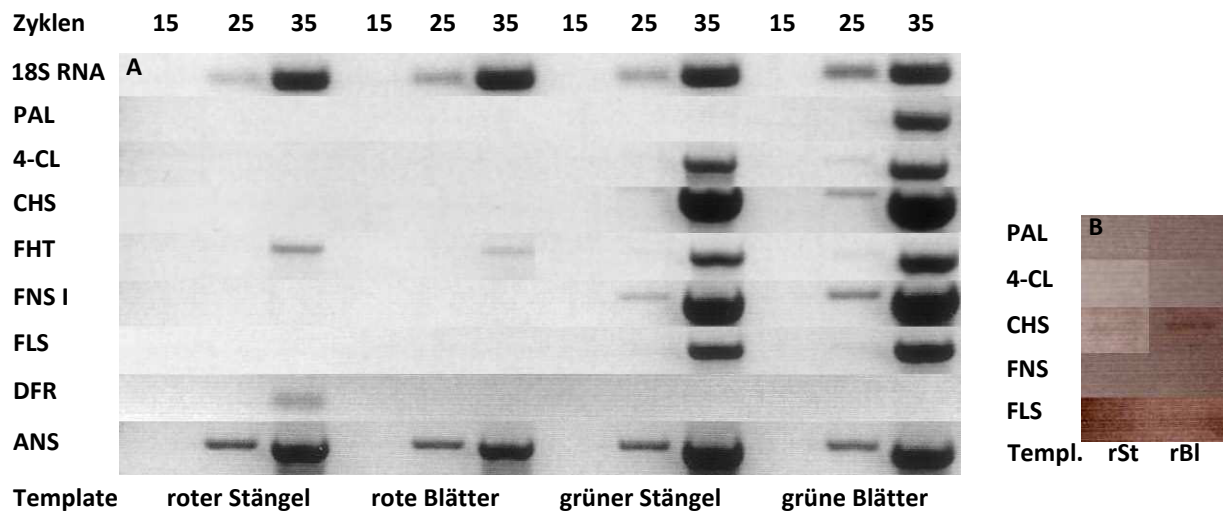


Abbildung 60

Semi-quantitative PCR-Amplifikation zum Nachweis verschiedener Enzym-Transkripte aus der Phenylpropan-Biosynthese im Gewebe von Petersilie-Pflanzen ohne und nach Stress-Induktion.

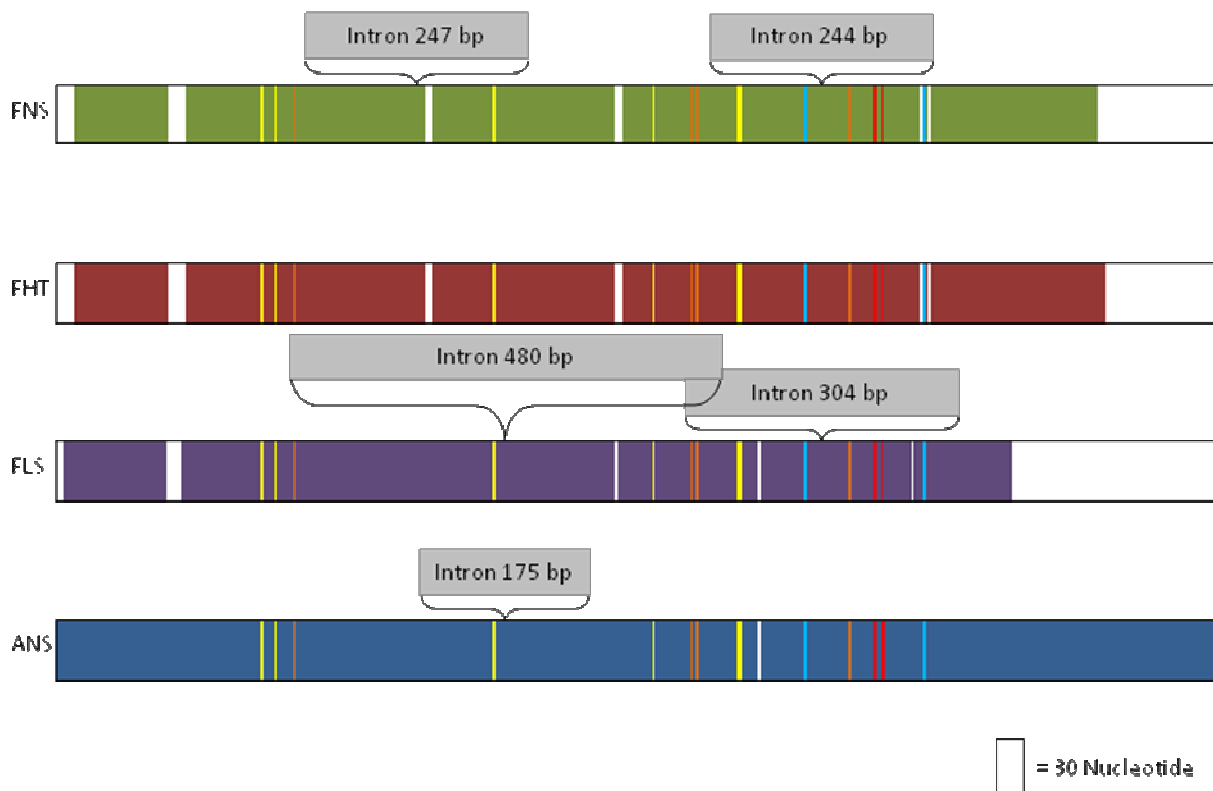
(A) Als Template wurde die *Pc* Gesamt-cDNA des jeweils angegebenen Gewebes verwendet. Es wurden Vollängen-Primer zur Amplifikation von PAL, 4-CL, CHS, FHT, FNS I, FLS, ANS oder 18S-RNA sowie degenerierte Primern für DFR-Sequenzen verwendet. Die PCR wurde unter Standardbedingungen bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C über 15, 25 bzw. 35 Zyklen durchgeführt.

(B) Unter den gewählten Bedingungen (A) im roten Pflanzengewebe waren einige Transkripte nicht nachweisbar. Die wiederholte PCR mit erhöhter Zyklenzahl (40) sowie verdoppelter Primer- und Template-Konzentration zeigt einen zusätzlichen Nachweis von CHS- und FLS-Transkripten in roten Stängeln (rSt) und roten Blättern (rBl).



#### 4. gDNA-Sequenz-Analyse der ANS aus Petersilie

Der genomische Klon der putativen ANS wurde mit den oben beschriebenen Voll­längen-Primern und der genomischen DNA aus Petersilie als Template amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in Bakterien kloniert und zur Sequenzanalyse eingeschickt. Durch Vergleich dieser Sequenz mit der aus RT-PCR ermittelten cDNA-Sequenz der ANS aus Petersilie wurde ein Intron identifiziert, das dem Einschub entspricht, der bereits bei der Klonierung der ersten cDNA-Sequenz erwähnt wurde (V.2.1.). Somit wurde die frühere Vermutung, dass es sich hierbei um die Kopie der genomischen DNA handelt, bestätigt. Das Intron der Länge von 175 bp ist ein Intron der Phase 2 (Abbildung 61). Dies bedeutet, dass das Intron vor der dritten Base eines Codons liegt, was für ANS-Sequenzen üblich ist (Prescott und John, 1996).



**Abbildung 61**

Schematische Darstellung der Intron-Positionen in Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese am Beispiel der Gene in Petersilie nach Prescott und John (1996), Gebhardt et al. (2005)

Farbig markierte Balken entsprechen Codons konservierter Aminosäuren: Gelb = Aminosäuren, die für die Faltung wichtig sind; Orange = Aminosäuren (HxD-Motiv + H) zur Komplexierung des Eisen-II-Ions im aktiven Zentrum; Rot = RxS-Motiv zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats in der Bindetasche; Hellblau = Aminosäuren, deren Funktion noch nicht bekannt ist; Weiß = Deletionen.

In 2-ODD sind die Positionen vier verschiedener Introns sehr stark konserviert. Drei von diesen vier Positionen sind auch in der Flavonoidbiosynthese vertreten. Folgt man dieser Nummerierung der Positionen, liegt das Intron der putativen ANS aus Petersilie in Position drei, wie auch die Introne anderer ANS-Gene (Prescott und John, 1996; Gebhardt et al, 2005).

## 5. Proteinanalyse

### 5.1. Vergleich der konservierten Aminosäuren

Für ein Homology-Modeling der putativen ANS aus Petersilie (*PcANS*) wurde zunächst die Polypeptid-Sequenz mit der ANS aus *A. thaliana* (*AtANS*) in den konservierten Bereichen verglichen (Abbildung 62). Alle konservierten Bereiche lassen sich in der *PcANS*-Sequenz wiederfinden. Sowohl die konservierten Aminosäuren (gelb markiert) in den allgemein konservierten Bereichen der 2-ODDn (unterstrichen), die für die Faltung des Proteins und die Substratbindung verantwortlich sind, als auch die für die Koordination des Kofaktors Eisen(II) benötigten Aminosäuren im HxD-Motiv und dem zusätzlichen His292 lassen sich in diesem Alignment nachweisen (grün angefärbt). Auch die 2-Oxoglutarat-Bindestelle mit dem RxS-Motiv (violett markiert) lässt sich eindeutig wiederfinden. Zusätzlich konnten zwei hellblau angefärbte, konservierte Aminosäuren in der Sequenz der *PcANS* lokalisiert werden, die als streng konserviert gelten, deren Funktion jedoch bisher unbekannt ist (Britsch et al., 1993; Lukačín und Britsch, 1997).

Ein deutlicher Unterschied lässt sich jedoch in der Länge der Sequenzen feststellen. Die putative ANS aus Petersilie zeigt eine um 68 Aminosäuren längere Sequenz, was bei einer Gesamtlänge von knapp 360 Aminosäuren der ANS aus *A. thaliana* eine Verlängerung um 17 % ausmacht.

	10	20	30	40	50	60
AtANS	MVAVERVESLAKSGIIISIPKEYIRPKEELESINDVFLEEKKEDGPQVPTIDLKNEI					
PcANS	MVTTTSVSPRVETLAGSGIQLIPKEYVRPKDELISITNIFEEKNVEGPQVPIIDISDIV					
	*** ** *	*****:***:*	** *	:*: *	***	***** **: *
	70	80	90	100	110	120
AtANS	SDDEKIRENCIEELKKAASLDWGVMLHINHGIPADLMERVKKAGEEFFSLSVEEKEYAND					
PcANS	SDDTIVREKCHDMIKEAAVEWGVMLHVNHGISREPMDRVVRVAGQSFFAEPIGEKEYAND					
	*** **:***:*	: : : : *	: : : : : *	*****:***:*	: **: **: *	: : : : : *****
	130	140	150	160	170	180
AtANS	QATGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEEKRDLSIWPKTPSDYIEATSEYAKCL					
PcANS	PGTGMIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLVYPEEKADLSLWPKRPQDYIPATREYAKEL					
	.:***:*****	*****:***:*** *	***:*** *	*** *	*** *	*** *
	190	200	210	220	230	240
AtANS	RLLATKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVS					
PcANS	RGLTTKLLSALSGLGLEEGRLEKEVGGMEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVS					
	* *:***:*	***:*****	.*****:*****	*****:*****	*****:*****	*****:*****
	250	260	270	280	290	300
AtANS	ALTFILHNMVPGQLLFYEGKWVTAKCVPDSIVMHI					
PcANS	ALSFILHNMVPGQLLFYGGKWVTAKCVPNSIIVHI					
	***:*****	*****:***:*	*****:*****	*****:*****	*****:*****	*****:*****
	310	320	330	340	350	360
AtANS	VRISWAVFCEPPKDKIVLKLPEMVSVESPAKFPPRTFAQHIEHKLFGKEQEELVSEKND					
PcANS	VRISWALFCEPPKEKIIILKLPETVTEAEPPLFPPRTFAQHMAHKLFRNSQEATDSEKVE					
	*****:*****:***:***** *	: *. *	*****: *** *	*** *	*** *	*** *
	370	380	390	400	410	420
AtANS	-----					
PcANS	PKVQDYANTEIPQPGEHKKTEETKPPETEISEPCEEDTGFLKAEISQPLELNNPPKSKN					
	427					
AtANS	-----					
PcANS	SVPAIKG					

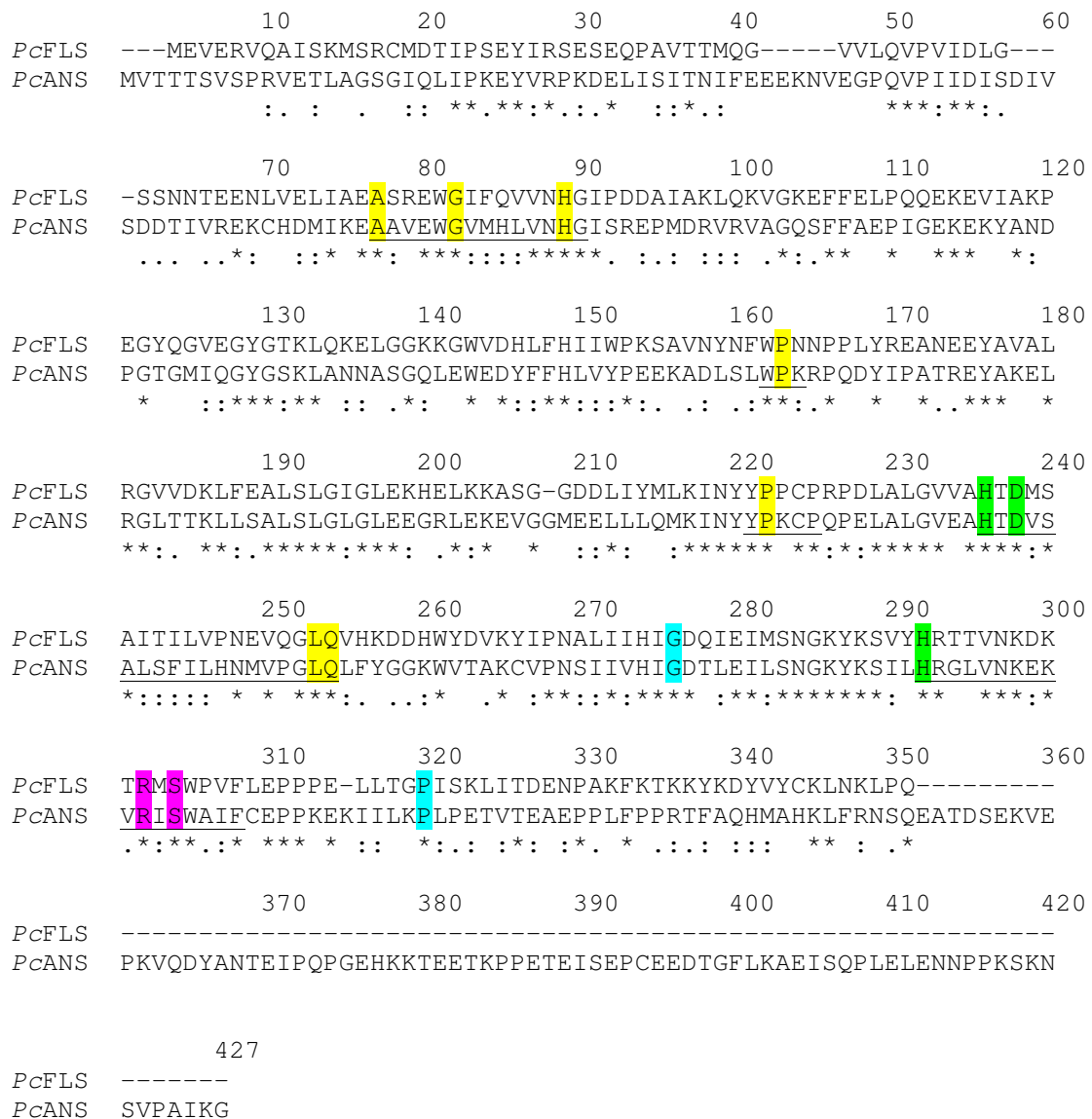
Abbildung 62

Polypeptid-Alignment von AtANS und PcANS.

Farbig markierte Aminosäuren entsprechen konservierten Aminosäuren: Gelb = Aminosäuren, die für eine richtige Faltung wichtig sind; Grün = Aminosäuren (HxD-Motiv + H) zur Komplexierung des Eisen-II-Ions im aktiven Zentrum; Violett = RxS-Motiv zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats in der Bindetasche; Blau = Aminosäuren, deren Funktion noch nicht bekannt ist.

Die Sequenzen der putativen ANS und der FLS aus Petersilie zeigen die erwartete Übereinstimmung aller strikt konservierten Aminosäuren (Abbildung 63). Es ist jedoch auch zu erkennen, dass gerade in den konservierten Bereichen der Faltung und Substratbindung deutlich weniger Übereinstimmungen vorhanden sind als zwischen putativer PcANS und AtANS.





### Abbildung 63

### Polypeptid-Alignment von *PcFLS* und *PcANS*.

Farbig markierte Aminosäuren entsprechen konservierten Aminosäuren: Gelb = Aminosäuren, die für eine richtige Faltung wichtig sind; Grün = Aminosäuren (HxD-Motiv + H) zur Komplexierung des Eisen-II-Ions im aktiven Zentrum; Violett = RxS-Motiv zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats in der Bindetasche; Blau = Aminosäuren, deren Funktion noch nicht bekannt ist.

## 5.2. Struktur-Modeling der ANS aus Petersilie

Das Modeling der PcANS in die Kristallstruktur der ANS aus *A. thaliana* zeigt eine deutliche Übereinstimmung des Backbones beider Proteine. Bei näherer Betrachtung zeigt sich ebenfalls eine weitreichende Übereinstimmung der Oberfläche der berechneten 3D-

Struktur. Neben Abweichungen an der Oberfläche der Strukturen, die keinen Einfluss auf das Reaktionsverhalten des Enzyms haben sollten, konnten vier Abweichungen auch im Bereich bzw. in der Nähe der Substrat- und Kofaktorbindestelle festgestellt werden.

Zum einen wurde eine Mutation des Gln117 in *AtANS* zu Pro121 in *PcANS* festgestellt (Abbildung 64A). Dadurch verändert sich der Eingangsbereich der Substratbindetasche. Die Oberflächen weichen ein wenig mehr auseinander, da die funktionelle Gruppe des Glutamins wesentlich weiter in den Raum ragt und mehr Wechselwirkungen auf ein diffundierendes Substrat bzw. Produkt hat als die relativ kleine und unpolare funktionelle Gruppe des Prolins in *PcANS*.

Zum anderen fand sich ein Unterschied im Glu306 der *AtANS* gegenüber Glu310 der *PcANS* (Abbildung 64B). Hier zeigte sich eine leichte Oberflächenveränderung in der Substratbindetasche aufgrund eines veränderten Verhaltens der Seitenketten der Glutaminsäuren in der Kristallstruktur und dem berechneten Modell, die das Bindeverhalten des Substrates jedoch nicht ändern sollte.

Ein weiterer Unterschied konnte ebenfalls in der Substratbindetasche aufgrund der Mutation des Ile338 in *AtANS* zu Met342 in *PcANS* gefunden werden (Abbildung 64C). Es handelt sich in beiden Fällen um Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette. Durch die fehlende Verzweigung in der Seite des Methionins ragt diese Seitenkette ein wenig weiter in das aktive Zentrum herein und verkleinert somit die Bindetasche.

Die letzte, möglicherweise relevante Mutation vom Thr239 in *AtANS* zu Ser243 in *PcANS* betrifft die Koordination des Eisen(II)ions (Abbildung 64D). Die Seitenkette des Threonins endet in einer Gabel aus einer Methylgruppe und einer Hydroxylgruppe. Aufgrund der Größe und der sterischen Wechselwirkungen mit umgebenden funktionellen Gruppen scheint diese Seitenkette relativ fest verankert zu sein und mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindung die für die Komplexierung des Eisen(II)ions mitverantwortliche Asparaginsäure zu stabilisieren. Die Seitenkette des Serins ist um ein C-Atom kürzer. Auch an diesem im Vergleich zum vorletzten Kohlenstoffatom des Threonins gleich positionierten Kohlenstoffatoms befindet sich eine Hydroxylgruppe. Aufgrund der fehlenden zusätzlichen Methylgruppe besitzt diese Hydroxylgruppe eine wesentlich höhere Flexibilität, die die Stabilisierung der komplexierenden Asparaginsäure vermindern könnte.

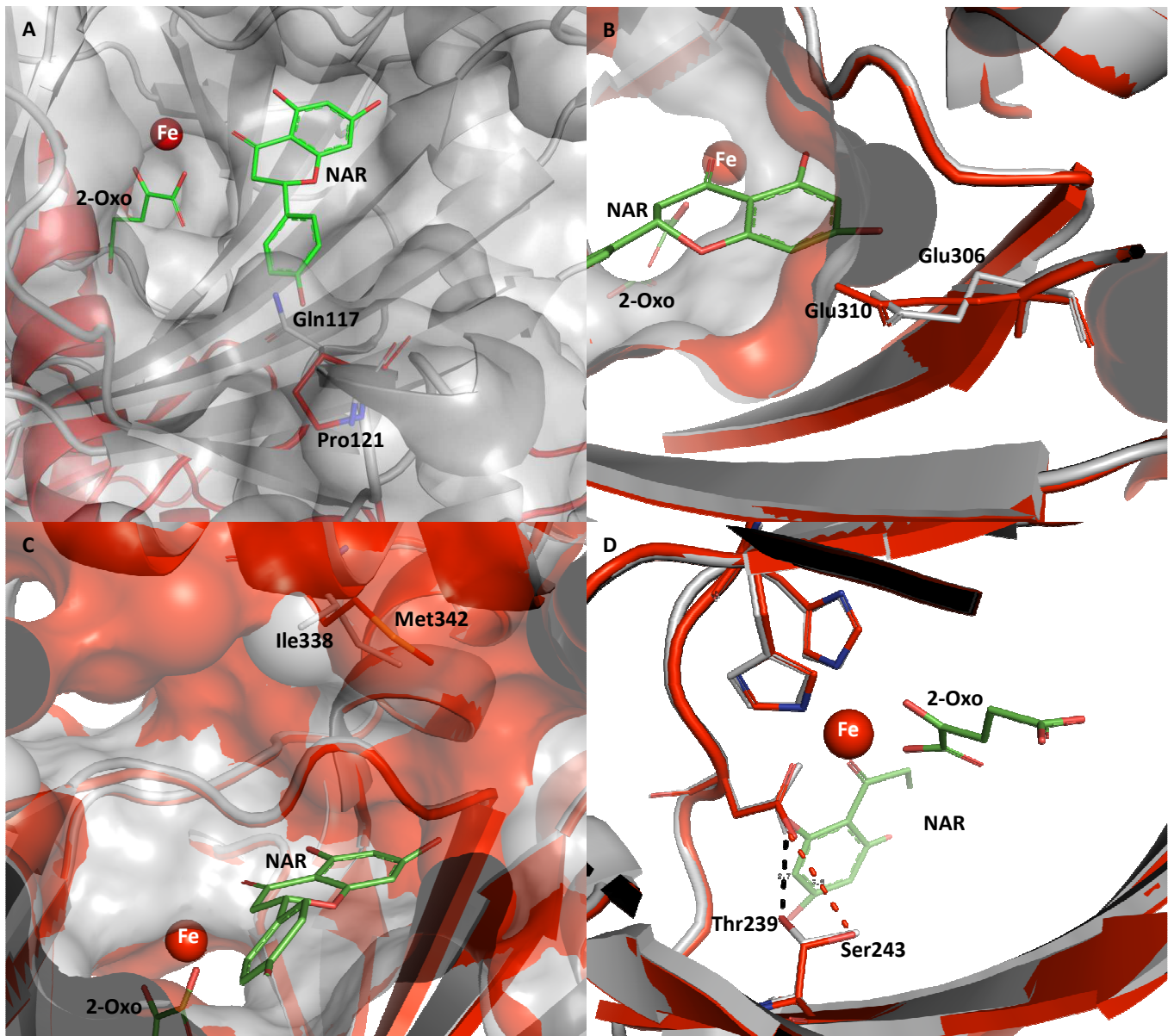


Abbildung 65

Unterschiede im Modell der *PcANS* zur Kristallstruktur der *AtANS*

- (A) Mutation des Gln117 in *AtANS* zu Pro121 in *PcANS*
- (B) Verschiebung des Glu310 der *PcANS* im Vergleich zu Glu306 der *AtANS*
- (C) Mutation des Ile338 in *AtANS* zu Met342 in *PcANS*
- (D) Mutation des Thr239 in *AtANS* zu Ser243 in *PcANS*

## 6. Phylogenetische Analyse

Für eine eindeutige Zuordnung der *PcANS* fehlt der endgültige Nachweis der ANS-Aktivität des heterolog exprimierten Proteins. Deshalb wurde eine phylogenetische Analyse mit verschiedenen ANS- bzw. FLS-Sequenzen und der Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) aus *H. sapiens* als Außengruppe durchgeführt. Die Wahl der Vergleichspolypeptide konnte auf Sequenzen dieser beiden Untergruppen eingeschränkt werden, da bekannt ist, dass die Enzyme einer gemeinsamen katalytischen Funktion jeweils auch eine Untergruppe in Stammbäumen bilden (Gebhardt et al., 2005). Aufgrund des Umsatzes von Dihydroflavonolen zu Flavonolen in der Biotransformation mit dem exprimierten Enzym war demnach lediglich ein Vergleich mit den Untergruppen der FLS und ANS nötig.

Die ausgewählten Sequenzen wurden zusammen mit der ANS-Sequenz paarweise verglichen. Auf Basis dieses Vergleiches der identischen Basen wurde der phylogenetische Stammbaum mit dem Programm MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007) anhand der Neighbor-Joining-Methode mit 1000 Wiederholungen abgeleitet. Die Analyse zeigte wie erwartet eine klare Teilung der ANS- und FLS-Sequenzen in zwei Gruppen. Die putative ANS-Sequenz aus Petersilie konnte im Stammbaum eindeutig der Untergruppe der übrigen ANS-Sequenzen zugeordnet werden (Abbildung 65) und damit die hohe Identität dieses Polypeptids mit anderen ANS-Sequenzen, insbesondere die hohe Identität zur ANS aus Möhre, bestätigt werden.

Der phylogenetische Stammbaum zeigte weiter eine Einteilung der Aminosäuresequenzen innerhalb einer Enzymuntergruppe, die weitgehend der taxonomischen Anordnung (NCBI taxonomy database) der entsprechenden Pflanzen entspricht.

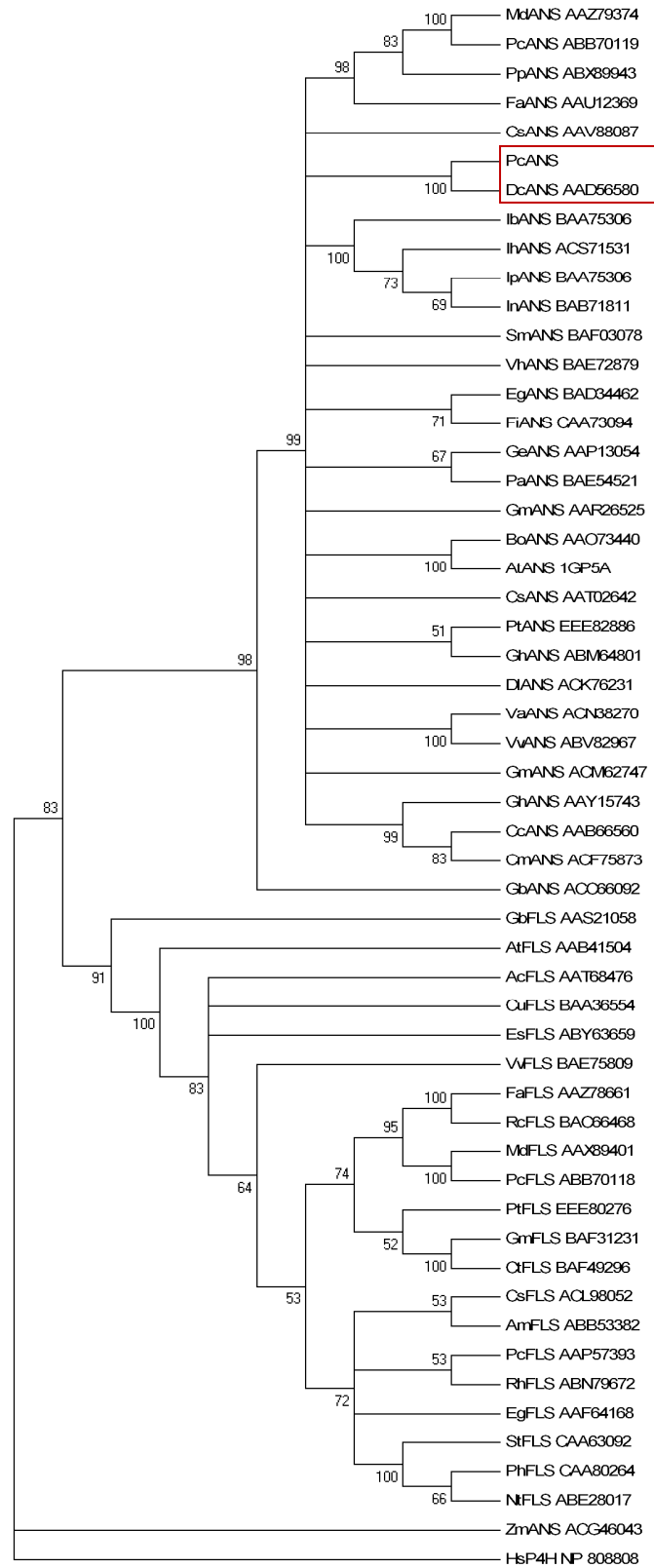


Abbildung 65

Phylogenie-Baum mit FLS- und ANS-Sequenzen sowie P4H aus *H. sapiens* als Außengruppe

Accession-No.: siehe Anhang

## VI. Diskussion – *E. arvense*

### 1. Einordnung der katalytischen Dioxygenase-Aktivitäten in *E. arvense*

Die durchgeführten enzymatischen Untersuchungen mit Pflanzenrohextrakt zeigen den Umsatz von Flavanonen zu Flavonen und Flavonolen. Dihydroflavonole hingegen, die als Zwischenprodukt entstehen müssten, konnten nur in sehr kleinen Mengen mittels LC-MS-Analytik nachgewiesen werden. Um die Enzymklasse zu identifizieren, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Es wurden zum einen Tests mit Pflanzenrohextrakt in Abwesenheit von Kofaktoren durchgeführt, die lediglich eine Aktivitätsminderung aufwiesen, während entsalzter Extrakt eine absolute Abhängigkeit von den üblichen Kofaktoren 2-Oxoglutarat, Eisen(II)ionen, O<sub>2</sub> und Ascorbat aufwies (Tabelle 2). Diese Restaktivität kann mit im Rohextrakt enthaltenden und im Enzym bereits gebundenen Kofaktoren erklärt werden. Zum anderen konnten neben der Kofaktorabhängigkeit weitere übliche 2-ODD-Merkmale wie die Labilität der Aktivität und optimale Enzymaktivität bei leicht sauren pH-Werten (pH 6) (De Carolis und De Luca, 1994; Anzellotti und Ibrahim, 2000; Wellmann et al., 2002; Clifton et al., 2006; Dissertation Y.H. Gebhardt, 2007) sowie allgemeine enzymatische Merkmale wie die Inaktivierung durch Hitze beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich um eine enzymkatalysierte Reaktion einer 2-ODD handelt.

Eine weitere interessante Eigenschaft ist die geringe Aktivität des entsalzten Enzymextraktes in Abwesenheit der Eisen(II)ionen (Tabelle 2), während alle anderen Enzymtests in Abwesenheit mindestens eines Kofaktors keinen Umsatz zeigten. Tatsächlich ist aus bisherigen Veröffentlichungen bekannt, dass 2-Oxoglutarat und Eisen(II)ionen für den Reaktionsmechanismus der 2-ODDn essentiell sind (Clifton et al., 2006), während Ascorbat als Oxidationsschutz für das Enzym und das Eisen(II)ion nur einen indirekten Einfluss auf die Reaktion hat (Myllylä et al., 1978; Anzellotti und Ibrahim, 2000; Prescott und Lloyd, 2000; Clifton et al., 2006). Im Gegensatz zu den Messergebnissen aus Tabelle 2 wäre also kein Umsatz in Abwesenheit von Eisen(II)ionen zu erwarten. Diese Beobachtung lässt sich durch den kationenreichen Proteinextrakt des Ackerschachtelhalms (Nagai et al., 2005) erklären, der auch nach Gelfiltration noch Eisen(II)ionen enthalten kann, welches beispielsweise bereits im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden war.

Weiter weisen die Messergebnisse aus Tabelle 2 Ascorbat einen höheren Stellenwert zu als der angenommene Reaktionsmechanismus (Clifton et al., 2006) erwarten lässt. So konnte in den durchgeführten Enzymtests bereits bei alleiniger Abwesenheit des fakultativen Kofaktors Ascorbat keine Enzymaktivität gemessen werden. Versuche zur Stabilität der Extraktaktivität zeigten, dass die beteiligten Enzyme sehr oxidationsempfindlich sind (Abbildung 16), was den Schutz durch Ascorbat unabdingbar machen könnte (Myllylä et al., 1978; Myllyharju und Kivirikko, 1997; Prescott und Lloyd, 2000). Dies erklärt die zwingende Notwendigkeit für Ascorbat im Enzymtest.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss von Inhibitoren auf die beobachtete Reaktion erfasst. Es konnte eine Verminderung der Enzymaktivität durch typische 2-ODD-Inhibitoren erreicht werden, während Cytochrom P450-Inhibitoren keinen Einfluss auf den Umsatz zeigten (Tabelle 3). Eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase-Aktivität wäre ohnehin nicht im löslichen Überstand, sondern in der mikrosomalen Fraktion zu erwarten und sollte im schwach basischen Milieu aktiv sein. Die beobachteten leichten Schwankungen in Tests mit Cytochrom P450-Inhibitoren sind dabei nicht auf einen Einfluss der Inhibitoren, sondern auf Aktivitätsschwankungen in den Enzymtests zurückzuführen. Ferner war das Ergebnis des Hemmversuches mit Diethylpyrocarbonat überraschend, das als allgemein enzyminhibierende Substanz keine inhibitorische Wirkung auf die Reaktionen zeigte (Tabelle 3). Diethylpyrocarbonat ethoxyformyliert Proteine, insbesondere an Histidinresten, reagiert aber auch z. B. mit RNA. Die Substanz zerfällt sehr schnell in wässrigen Puffern, und es ist möglich, dass sie unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht mehr wirksam war. Ebenfalls bemerkenswert ist der unterschiedliche Einfluss des Pyruvats auf die Enzymreaktionen (Tabelle 3), der sich durch den unterschiedlichen Bedarf der 2-ODDn an Ascorbat zum Oxidationsschutz ergibt. Durch die Fähigkeit des Ascorbats das Eisen(II)ion in seiner Oxidationsstufe zu halten werden viele 2-ODDn sogar erst aktiviert (Anzellotti und Ibrahim, 2000; Prescott und Lloyd, 2000; Clifton et al., 2006). Neben der Sicherung der Oxidationsstufe des Eisen(II)ions schützt das Antioxidans auch das Enzym vor Autoxidation, wie beispielsweise anhand der Prolyl 4-Hydroxylase gezeigt werden konnte (Myllylä et al., 1978). Ascorbat kann die Reaktion jedoch auch durch die unabhängige Decarboxylierung des 2-Oxoglutarats negativ beeinflussen (Clifton et al., 2006). Der Zusatz von Pyruvat könnte aufgrund seiner chemischen Eigenschaften die antioxidative Kapazität des Ascorbats

verstärken und folglich je nach Enzym einen unterschiedlichen Einfluss auf die Enzymreaktion möglich machen (Myllyharju und Kivirikko, 1997; Prescott and Lloyd, 2000).

Ausgehend von der Annahme, dass die untersuchten Reaktionen von 2-ODDn katalysiert werden, stellt sich die Frage, welches und wie viele Enzyme an der Reaktion beteiligt sind. Eine Möglichkeit ist, dass ein multifunktionelles Enzym die FNS I-, FHT- und FLS-Reaktionen katalysiert. Dies wäre ein phylogenetisch interessanter Fall, da dies auf eine Urform der Dioxygenasen in der Flavonoidbiosynthese hinweisen würde. So sind verschiedene, multifunktionelle Dioxygenasen in der Flavonoidbiosynthese und in anderen Biosynthesewegen beschrieben, die in der Regel jedoch nicht mehr als zwei Reaktionen katalysieren. Beispielsweise führen in der Gibberellin-Biosynthese 2-ODDn, also die GA 20-Oxidase, GA 3 $\beta$ -Hydroxylase oder GA 2-Oxidase, eine Oxidation an spezifischen Positionen des Ringsystems durch. Sie verläuft jeweils in mehreren Schritten von der Hydroxylierung bis zur Keto- oder Säurefunktion, die alle von demselben Enzym katalysiert werden (Hedden und Phillips, 2000). Auch in *A. thaliana* kann die ANS zumindest zu einem gewissen Prozentsatz zur Synthese von Flavonolen beitragen, wie in Knock-out Linien der aktiven FLS1 (Wisman et al., 1998) gezeigt werden konnte. Hierdurch konnte die Synthese der weiterhin vorhandenen Flavonole durch Doppelmutation eindeutig der ANS zugewiesen werden. Auf diese Weise wurde die bislang nur *in vitro* beschriebene Nebenreaktion der ANS zum ersten Mal auch als *in planta* relevant nachgewiesen (Martens et al., 2010; Preuss et al., 2009). Die These des einen multifunktionellen Enzyms in *E. arvense*, und damit der direkte Umsatz von Flavanonen zu Flavonolen bzw. Flavonen, wird durch Untersuchungen zur Substratspezifität mit Flavanonen und Dihydroflavonolen als Substrat gestützt. Radioaktiv markierte Flavanone werden umgesetzt (Abbildung 12 und 14), wohingegen der Umsatz von Dihydroflavonolen zunächst nicht nachgewiesen werden konnte. In der LC-MS-Analyse sind jedoch Spuren von DHK beim Umsatz von NAR zu Km und Ap detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass NAR in einer Reaktion über DHK zu Km umgesetzt wird, das Zwischenprodukt jedoch in nicht nennenswerter Menge freigesetzt wird. Es bleibt die Frage offen, ob kleinste Mengen DHK doch als Substrat akzeptiert werden, was aber mit der spezifischen Radioaktivität des Substrates nicht detektiert werden konnte.

Abweichend zu der These eines einzelnen multifunktionellen Enzyms kann bei der Betrachtung der Enzymtests mit Hemmstoffen eine unterschiedlich starke Inhibition der Bildung von Ap und Km festgestellt werden (Tabelle 3). Dieses Ergebnis lässt darauf



schließen, dass es sich um mindestens zwei Enzyme handelt, die die beobachteten Reaktionen katalysieren. Neben einem Enzym mit FNS I-Aktivität könnte demnach eine bifunktionelle FLS vorliegen, die nicht nur die Synthese des Flavonols, sondern auch die Bildung des Zwischenproduktes Dihydroflavonol katalysiert. Dabei muss die Umsetzung des gebildeten Dihydroflavonols zum Flavonol schnell und nahezu vollständig ablaufen, so dass die Bildung des Dihydroflavonols erst durch Einsatz der LC-MS-Analytik nachgewiesen werden konnte. Diese FHT-Nebenaktivität einer FLS wurde bereits mehrfach beschrieben (Prescott et al., 2002; Lukačín et al., 2003; Turnbull et al., 2004; Owens et al., 2008). Dabei hängt die Vollständigkeit des Umsatzes von der Enzymaktivität ab. So setzt die beschriebene FLS aus *Citrus unshiu* NAR nahezu vollständig zu Km um. Andere FLS, wie die aus *A. thaliana*, weisen lediglich einen partiellen Umsatz des NAR zu DHK und auch eine nur partielle Katalyse zu Km auf. Eine endgültige Aussage zu den katalytischen Eigenschaften lässt sich aber erst treffen, wenn die kinetischen Bedingungen der Messungen optimiert und sorgfältig verglichen wurden.

Die Synthese von Dihydroflavonolen und Flavonolen durch die 2-ODDn FHT und FLS ist in allen flavonolhaltigen Pflanzen verbreitet. Auch das Vorkommen von Flavonen ist weitverbreitet. Obwohl aber diese Untergruppe der Flavonoide meist von der FNS II gebildet wird, die zur Enzymklasse der Cytochrom P450 Monooxygenase gehört, kann die Beteiligung dieser Enzymklasse bei der vorliegenden untersuchten Reaktion aufgrund der eindeutigen Reaktionsparameter ausgeschlossen werden. Somit wurde in *E. arvense* genau die 2-ODD-Reaktion, die FNS I-Aktivität, nachgewiesen, die bisher nur aus der Familie der Apiaceae bekannt ist (Martens und Mithöfer, 2005; Gebhardt et al, 2007). Das Vorkommen der FNS I-Reaktion in *E. arvense* stellt somit eine große Wissenserweiterung zur Evolution der Flavonoidbiosynthese dar, auf der sich weitere, bisher unbeantwortete Fragestellungen aufbauen lassen:

- Welche Identität zeigt das Enzym zu bereits bekannten FNS I-Polypeptid-Sequenzen aus Pflanzen der Apiaceae?
- Wie wahrscheinlich sind FNS I-Aktivitäten in weiteren Pflanzenfamilien und welchen Verwandtschaftsgrad weisen die Nucleotid- und Polypeptid-Sequenzen der Enzyme auf?

- Welche Rückschlüsse lassen sich daraus auf die evolutionäre Entwicklung der Flavonoid-Biosynthese ziehen?
- Was bedeutet dies für bisherige Annahmen in der evolutionären Entwicklung?

Die Identität der 2-ODDn aus *E. arvense*, vor allem die des Enzyms mit FNS I-Aktivität, mit analogen Enzymen aus anderen Pflanzen ist deswegen ein interessantes Thema, weil *E. arvense* aus der Familie der Equisetaceae, Abteilung Pteridophyta, und die Familie der Apiaceae, Abteilung Spermatophyta, nach allgemeinen taxonomischen Annahmen sehr verschiedenen eingruppiert werden und in ihrer evolutionären Entwicklung weit auseinander liegen. Bisher bekannte Polypeptid-Sequenzen verschiedener FNS I zeigen untereinander eine sehr hohe Identität von ca. 90 %, was allerdings mit der Begrenzung auf eine Unterfamilie begründet werden kann (Gebhardt et al, 2005). Über verschiedene Familien hinweg zeigen Polypeptid-Sequenzen von FLS und FHT eine relativ hohe Identität von immerhin ca. 50 bis 70 % (Britsch et al., 1992; Wellmann et al., 2002; Martens et al., 2003). Ob aber diese hohe, familienübergreifende Identität auch für FNS I gilt, ist fraglich. Eine hohe Übereinstimmung würde auf eine frühe Entwicklung des Enzyms im Genom eines gemeinsamen Vorfahrens hinweisen. Folglich stellt sich die Frage, warum dieses Enzym anscheinend wesentlich geringer verbreitet bzw. nachweisbar ist als FNS II-Monooxygenasen oder 2-ODDn anderer Funktion. Erste Hinweise auf eine eher gering einzuschätzende Identität lieferten die Ergebnisse aus PCR-Amplifikationen der cDNA-Bank. Allerdings fehlen z. Zt. noch Beweise zur Funktionalität bzw. die gesicherte Zuordnung der Amplifikate.

Rückschlüsse auf 2-ODDn aus *Equisetum*, die an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, können dennoch mit Blick auf analoge 2-ODDn aus anderen Pflanzen gezogen werden. 2-ODDn von verschiedener Funktionalität zeigen eine gemeinsame Grundidentität von ca. 30 % (Prescott und John, 1996), die vermutlich die für die Bindung der Kofaktoren und die richtige Faltung verantwortlichen Aminosäuren widerspiegeln. Die Ähnlichkeit der Polypeptid-Sequenzen hilft allerdings nur begrenzt bei der Suche auf DNA-Ebene bzw. bei der Entwicklung degenerierter Primer für die PCR weiter.

## 2. Stabilität der Enzymaktivität im Pflanzenextrakt

In den durchgeführten Untersuchungen ist zu beobachten, dass die extrahierbare Enzymaktivität im Laufe der Vegetationsperiode des sterilen *Equisetum*-Sprosses abnimmt, welches zwei Gründe haben kann. Erstens ist zu Beginn der Wachstumsperiode eine erhöhte Expression von Enzymen zur Bildung von Flavonen und Flavonolen aufgrund des benötigten UV- und Oxidationsschutzes nötig. Nach ausreichender Anreicherung dieser Substanzen ist ein bedarfsgerechter Rückgang der Expression der benötigten Proteine zu erwarten, was durch andere Untersuchungen bestätigt wird. So werden beispielsweise die höchsten Aktivitäten einer FNS I oder FNS II in den Geweben verschiedener Pflanzen kurz nach der Keimung nachgewiesen (Sutter et al., 1975; Hahlbrock und Grisebach, 1979; Britsch, 1990a). Auch die FHT aus einer rot blühenden *P. hybrida* Mutante zeigt ebenfalls in sehr jungen Geweben die höchste Aktivität (Britsch und Grisebach, 1986). Zweitens kumulieren mit zunehmendem Alter die Silikate in den Sprossen des Ackerschachtelhalms und lassen diese verhärten. Aus diesem Grund ist im späteren Verlauf der Vegetation eine intensivere Aufarbeitung des Sprosses bis zur Homogenisierung nötig, bei der zwangsläufig mehr Sauerstoff in den Pflanzenaufschluss eingearbeitet wird. 2-ODDn sind jedoch allgemein oxidationsempfindlich (Saito et al., 1999; Welford et al., 2005). So erwies sich etwa die native FHT aus einer *P. hybrida* Mutante sich als äußerst instabil und konnte erst durch Zusatz von verschiedenen Antioxidantien und mit Stickstoff entgasten Puffern (Britsch und Grisebach, 1986) so weit stabilisieren, dass eine weitere Bearbeitung unter Sauerstoffausschluss möglich war. Die 2-ODDn aus *Equisetum* zeigten sich in den durchgeführten Stabilitätstest ähnlich labil und wiesen bei der Proteinaufreinigung einen schnellen Aktivitätsverlust auf.

## 3. Versuche zur Enzymreinigung

Die FNS I-, FHT- und FLS-Enzymaktivitäten konnten mittels einer Ammoniumsulfat-Fällung in den Fraktionen mit 30-50 %iger und 50-80 %iger Sättigung angereichert werden (Abbildung 26). In den gefällten Fraktionen ist ein deutlicher Umsatz zu beiden beobachteten Produkten Ap und Km zu erkennen. Dies entspricht den Ergebnissen bisheriger

Ammoniumsulfat-Fällungen bei Aufreinigungen anderer 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese, bei denen sich jeweils die Fraktion von 35/40 - 80 % als aktiv erwies (Britsch und Grisebach, 1986; Britsch, 1990b; Anzellotti und Ibrahim, 2000).

Als weitere Schritte wurde der Extrakt über eine HIC aufgetrennt und anschließend mittels SEC aufgereinigt. Bei der Analyse der Durchlauf- und Elutionsfraktionen konnte in beiden Chromatographien lediglich ein Umsatz zu Km (FHT- und FLS-Aktivität) detektiert werden, währenddessen keine FNS I-Aktivität mehr festgestellt werden konnte (Abbildungen 27 + 28). Dieser Verlust der FNS I-Aktivität kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist bei einer nicht ausreichenden Ammoniumsulfat-Konzentration eine Bindung an der Säule der HIC nicht möglich. In beschriebenen Versuchen zur Aufreinigungen der FNS I aus Petersilie wurde mit einer Anfangskonzentration von 1,5 M Ammoniumsulfat begonnen und eine frühe Elution berichtet (Britsch, 1990b), während in der hier durchgeführten HIC eine Anfangskonzentration von 1 M Ammoniumsulfat gewählt wurde. Zum anderen beschreibt Britsch (1990b) einen starken Aktivitätsverlust des Enzyms bei der Aufreinigung der FNS I aus Petersilie mittels HIC. Ein solcher Aktivitätsverlust aufgrund des Salzes könnte auch bei Binden des FNS I-ähnlichen Enzyms den ohnehin geringen Umsatz unter die Nachweisgrenze drängen. Für eine Dialyse des Durchlaufs bzw. der Eluate war das Protein zu instabil.

Die Möglichkeit der Trennung der Aktivitäten ist ein weiteres Indiz für die Annahme, dass an den Reaktionen mindestens zwei Enzyme beteiligt sein müssen, da der alleinige Verlust einer Teilaktivität eines Enzyms nicht erklärbar ist.

Zur weiteren Identifizierung des am Umsatz von NAR zu Km beteiligten Enzyms bzw. der Enzyme wurden die katalytisch aktiven Fraktionen einem weiteren Reinigungsschritt mittels IEX unterzogen. Der Umsatz konnte überwiegend im Durchlauf, aber auch über die gesamte Breite der Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 29). Zur IEX stand DEAE-Sepharose zur Verfügung, während in den meisten beschriebenen Aufreinigungen von 2-ODDn Q-Sepharose als Säulenmaterial verwendet wurde, welches mit dem starken, quartären Ammonium-Anion eine deutlich höhere Ionenkapazität besitzt (Britsch und Grisebach, 1986; Britsch, 1990b; Anzellotti und Ibrahim, 2000). Es ist davon auszugehen, dass aufgrund des zu schwachen Anions keine Bindung auf der Säule stattgefunden hat. Weiter könnte eine Überladung der Säule und eine zu schnelle Elution das schlechte Trennergebnis erklären. Auch eine Optimierung des Puffers gestaltete sich als schwierig, da

aufgrund des unbekannten Proteins bzw. der Proteine und der noch großen Anzahl an Proteinen im Extrakt der isoelektrische Punkt nicht ermittelt werden konnte.

Zur weiteren Reinigungsoptimierung der beteiligten Enzyme wurden Affinitätschromatographien durchgeführt. Als erste Säule zur Affinitätschromatographie wurde ein Epoxid-Säulenmaterial mit 2-Oxoglutarat nach Anleitung des Herstellers gekoppelt (Anzellotti und Ibrahim, 2000), dessen Test-Aufreinigung mit rekombinanter FHT aus *P. crispum* nicht erfolgreich war. Im Gegensatz zur Aufreinigung der Desacetoxyvindolin 4-Hydroxylase aus *C. roseus* (De Carolis und De Luca, 1993), bei der eine reversible Inaktivierung des Enzyms nach der Affinitätschromatographie beschrieben wurde, konnte die Aktivität nicht wiederhergestellt werden, da in den Elutionsfraktionen weder durch UV-Detektion noch durch Gehaltsbestimmung nach Bradford Protein nachweisbar war. Dies ist vermutlich auf eine starke Verdünnung des Proteins zurückzuführen. Eine mögliche Fehlerquelle besteht darin, dass kein 2-Oxoglutarat fixiert wurde. Wahrscheinlicher ist hingegen die sterisch ungünstige Kopplung des 2-Oxoglutarats. In beiden Fällen ist das Säulenmaterial unbrauchbar. Die sterisch ungünstige Kopplung, die die Aufreinigung behindert oder sogar verhindert, kann durch Überladung der Epoxy-aktivierten Matrix bzw. durch die Bindung einer großen Menge des Liganden an der Matrix verursacht werden. Aber auch bei einer günstigen Kopplungsreaktion kann eine große Anzahl gebundener Liganden die Bindung großer Moleküle, wie Enzyme, ebenfalls sterisch erschweren (Manual, Pharmacia). Neben der Konzentration des Liganden, hier 2-Oxoglutarat, ist die Bindung von Temperatur, pH-Wert und Zeit der Kopplungsreaktion abhängig. Eine höhere Temperatur von 40 °C und ein erhöhter pH-Wert lassen die Reaktion schneller und unkontrollierter ablaufen, so dass Substanzen mit zwei funktionellen Gruppen in beiden Positionen gebunden werden können (Manual, Pharmacia). Aus diesem Grund wurde eine erste Kopplung unter gemäßigten Bedingungen durchgeführt (pH 8, Raumtemperatur, über 2h). Da das Säulenmaterial nicht die Fähigkeit besaß das Enzym zu binden, wurden die Kopplungsreaktion mittels erhöhtem pH (pH 11) verschärft und über Nacht ablaufen gelassen. Diese Bedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt um eine geeignete Kapazität der Säule zu erreichen; eine Mehrfachbindung des Liganden ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht auszuschließen. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Bindung des Enzyms erreicht werden. Es stellt sich die Frage, ob Bedingungen entgegen den Herstellerangaben zielführend gewesen wären. Beispielsweise wurde in Kopplungsversuchen mit aromatischen Aminen der pH-Wert

der Kopplungslösung sogar auf pH 6-7 gesenkt, um eine Kopplungsreaktion zu ermöglichen (Gelsema et al., 1981).

Eine weitere Affinitätschromatographie sollte das Bindevermögen von zweiwertigen Kationen  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ausnutzen (Britsch und Grisebach, 1986). Auch hier wurde die Funktion des Säulenmaterials zunächst mit einem rekombinanten Protein (FLS aus *A. thaliana*, ohne HisTag) getestet, dessen Aktivität nach der Chromatographie trotz Pufferwechsel (PD10-Säule) nicht mehr nachweisbar war. Dies kann an mehreren Gründen liegen. Die Bindestelle der zweiwertigen Kationen der 2-ODDn liegt sehr tief im Inneren der Struktur der Proteine, während ein rekombinant angehängter HisTag sich eher im peripheren Bereich der Tertiärstruktur befindet. Beim Vergleich der Grundstrukturen der Säulenmaterialien IMAC (BioRad), eine auf einer UNOSphere basierenden Matrix mit einem kurzem Chelatkomplex zur Bindung des zweiwertigen Kations, und der Cu-Chelat Sepharose 6b (Pharmacia; Britsch und Grisebach, 1986) ist zu erkennen, dass die Sepharose eine wesentlich höhere Flexibilität aufweist und somit sich eher der Tertiärstruktur des Proteins anpassen kann. Damit ist es vorstellbar, dass das Bindevermögen eines auf HisTag-Aufreinigung spezialisierten Säulenmaterials für diese Zwecke ungeeignet ist. Weiterhin kann die fehlende Aktivität im Durchlauf und in der Waschfraktion zum einen aufgrund einer hohen Verdünnung erklärt werden, da die Fraktionen vor dem Aktivitätstest lediglich umgepuffert, jedoch nicht dialysiert wurden. Zum anderen ist es möglich, dass der Wechsel des Puffersystems über PD10-Säulen nicht ausreicht, bereits gebundene zweiwertige Kationen zu entfernen. 2-ODDn können durch andere zweiwertige Kationen als Eisen(II)ionen stark gehemmt und inaktiviert werden (Britsch und Grisebach, 1986), was durch Zugabe von vermehrten Eisen(II)ionen im Enzymtest nicht reversibel sein muss. So wurden in Versuchen mit nativer FHT aus *P. hybrida* zweiwertige Kationen in Konkurrenz zu Eisen(II)ionen im Enzymtest eingesetzt. Dabei zeigte sich eine kompetitive Hemmung in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses des inhibierenden Kations zum Eisen(II)ion. Eine Reversibilität konnte allerdings bei 2-ODDn aus Ackerschachtelhalm nur sehr schwer erreicht werden, was diese Affinitätssäule als ungeeignet erscheinen lässt.

#### 4. Rekombinante Proteine

Die kodierenden Sequenzen zweier 2-ODDn wurden mittels PCR-Technik (*Ea*ODD1) und cDNA-Bank-Screening (*Ea*ODD2) kloniert und die rekombinanten Proteine mit verschiedenen Expressionssystemen heterolog exprimiert. In den folgenden Versuchen zur Aktivität der Proteine und ihrer Strukturen konnte keine enzymatische Aktivität mit den angebotenen Substraten der Flavonoidbiosynthese festgestellt werden, obwohl die Expression in Hefe und z. T. in Bakterien nachgewiesen werden konnte. Die Polypeptid-Sequenzen wiesen eine Identität von ca. 30 % zu FLS und anderen 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese, aber auch zu anderen 2-ODDn auf. Aufgrund der niedrigen Identität, die der allgemeinen Identität zwischen 2-ODDn aller Stoffwechselwege entspricht (Prescott und John, 1996), könnten die klonierten Transkripte aus Ackerschachtelhalm auch Proteinen anderer Stoffwechselwege als der Flavonoidbiosynthese zugeordnet werden und müssen nicht den im Pflanzenrohextrakt charakterisierten Enzymen entsprechen.

Geht man dennoch davon aus, dass Proteine der Flavonoidbiosynthese exprimiert wurden, kann diese Inaktivität auf unterschiedlichen Codon-Gebrauch in verschiedenen Organismen zurückzuführen sein. Die Einschränkung der gebräuchlichen Codons, die je nach Organismus unterschiedlich bevorzugt werden, hat den Vorteil die Effizienz der Translation zu verbessern, indem die Proteinbiosynthese beschleunigt und gleichzeitig die Fehlerrate minimiert wird (Goodarzi et al., 2008). Es ist vorstellbar, dass die Translation aufgrund des Fehlens eines passenden Anticodons einer t-RNA abgebrochen wird, wodurch kein überexprimiertes Protein in der richtigen Größe nachgewiesen werden könnte. Alternativ könnte die Translation mit einer fehlerhaften t-RNA weitergeführt werden (Grün et al., 2005). Dieses nun in der richtigen Größe detektierbare, exprimierte Protein kann aufgrund der fehlerhaft eingebauten Aminosäuren inaktiv sein. Das Vorkommen eines unterschiedlichen Codon-Gebrauches ist vor allem bei Bakterien aufgrund ihrer evolutionären Einstufung im Vergleich zu Pflanzen bekannt und auch bei Hefen möglich (Ikemura, 1985; Sharp et al., 1988).

Wahrscheinlicher ist jedoch neben dieser im Expressionssystem begründeten Inaktivität, dass die Enzymaktivität instabil ist, wie bereits mehrfach von 2-ODDn beschrieben wurde (De Carolis und De Luca, 1994; Lukačín et al., 2000). Ebenso ist eine generelle Inaktivität der klonierten und exprimierten Proteine aufgrund fehlender wichtiger Aminosäuren nicht

auszuschließen. Diese Annahme wird besonders bei der Betrachtung des Alignments der *Ea*ODD-Polypeptid-Sequenzen im Vergleich zur FLS aus *P. crispum* (Abbildung 43) deutlich. Die Analyse zeigt, dass verschiedene in 2-ODDn konservierte Aminosäuren in beiden Sequenzen abweichen. Es stellt sich die Frage, ob trotz der Abweichungen eine funktionsfähige Faltung des Proteins zu erhalten ist bzw. die Bindung des Substrates ausreichend stabil ist, so dass eine Funktion möglich ist. Aufgrund des fehlenden Phenylalanins in Position 324 des Alignments (Abbildung 43) in *Ea*ODD1, welches durch  $\pi$ -Stacking das Substrat stabilisieren würde, und des fehlenden Alanins in Position 71 des Alignments (Abbildung 43) in *Ea*ODD2 kann diese vorerst nicht angenommen werden.

Zur weiteren Analyse wurde das Gen des Transkripts *Ea*ODD2 kloniert und sequenziert. In der Literatur zur genomischen Analyse von 2-ODDn sind vier potentielle Positionen für ein Intron beschrieben (Prescott und John, 1996; Gebhardt et al., 2007). Demgegenüber besaß der genomische Klon von *Ea*ODD2 ein Intron an einer weiteren, bisher noch nicht beschriebenen Position. Auch dieses Ergebnis zeigt das Maß der Abweichung der Struktur auch auf genetischer Ebene und wie schwierig eine indirekte Zuordnung ist.

Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die phylogenetische Analyse der Polypeptid-Sequenzen verschiedener 2-ODD innerhalb und außerhalb des Flavonoidstoffwechsels und der beiden klonierten Proteinsequenzen unterstrichen. Beide klonierte Sequenzen können auch hier keinem Cluster einer bestimmten Funktionsuntergruppe zugeordnet werden, obwohl dies sonst in der Regel möglich ist (Gebhardt et al., 2005).

Diese erworbenen Erkenntnisse und die festgestellte niedrige Identität zwischen den neuen 2-ODDn Polypeptid-Sequenzen aus Ackerschachtelhalm und den Polypeptid-Sequenzen bekannter Enzyme des Flavonoid-Stoffwechsels lässt vermuten, dass es sich bei diesen exprimierten Proteinen nicht um Enzyme des gesuchten Biosyntheseweges handelt – auch wenn dies aufgrund der evolutionären Einordnung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Dennoch handelt es sich trotz einzelner Widersprüche um 2-ODDn, deren Funktion noch zu klären ist.



## VII. Diskussion – *P. crispum*

### 1. Zuordnung des stressinduzierten Farbstoffes in *P. crispum*

Pflanzen können auf Umwelteinflüsse wie etwa Hitze, Trockenheit, Kälte oder hoher UV-Einstrahlung mit der vermehrten Expression von Genen aus dem Flavonoid-Biosyntheseweg reagieren (Harborne und Williams, 2000). Auch in Petersilie-Pflanzen ist ein Anstieg der Flavonoide unter Stress nachweisbar. Es ist hinreichend bekannt, dass durch UV-Bestrahlung die *de novo* Synthese von Flavonon möglich ist bzw. die Konzentration in der Pflanze steigt (Britsch et al., 1981; Sutter et al., 1975). In Trockenstressversuchen konnte nun auch die Bildung eines roten Farbstoffes im Stängel der Pflanze beobachtet werden, der unter anderen Wachstumsbedingungen fehlt. Eine ähnliche Reaktion konnte in Ginkgo und *Vitis*-Zellkulturen mittels Wässerung mit hohen Salz- bzw. Saccharose- Konzentrationen nachgewiesen werden. Als Ursache wurde hier eine vermehrte Expression der ANS und somit die Bildung von Anthocyanidinen bzw. Anthocyanen nachgewiesen (Yamakawa et al., 1983; Xu et al., 2008).

Auch der Stress-induzierte rote Farbstoff in Petersilie zeigt ein Absorptionsmaximum bei 530 nm im Bereich der Anthocyane (lt. Literatur 465 bis 560 nm), die ihrem Absorptionsmaximum entsprechend blaue Farbpigmente sind, in Abhängigkeit der Substitution und des pH-Wertes jedoch auch eine violette bis magenta-rote Farbe haben oder sogar gelblich erscheinen können (Harborne und Williams, 2000). Anthocyane konnten mithilfe der DC nachgewiesen (Abbildung 48) und mittels UPLC-MS bestätigt werden. Bei der Auftrennung mittels UPLC konnten bei einer Wellenlänge von 489 nm im roten Extrakt Substanzen nachgewiesen werden, die in der MS-Analyse Glykosiden der Aglyka Cyanidin und Paeonidin zugeordnet werden konnten (Abbildung 49). Die genaueren Glykosylierungen konnten aufgrund der hohen mehrfachen Glykosylierungen nicht identifiziert werden. Auch konnten die isolierten Aglyka nach der Hydrolyse der Anthocyanidin-Glykoside unter sauren Bedingungen mit HCl nicht nachgewiesen werden, was auf eine Instabilität der Anthocyanidine unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Bereits in verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unter hydrolytischen, sauren Bedingungen eine Hydrolyse der Anthocyane fehlschlagen kann und die zerstörten Substanzen nicht mehr

detektierbar sind (Kim et al., 1989; Fleschhut et al., 2006; Castañeda-Ovando et al., 2009). Die nachgewiesenen, unterschiedlich mehrfach glykosylierten Aglyka entsprechen denjenigen Vorkommen in Pflanzen, die auch in anderen Anthocyan-haltigen Arten der Apiaceae überwiegend nachgewiesen wurden (Gläßgen et al., 1992; Miura et al., 1998; Mikanagil et al., 2000; Yan et al., 2005).

## 2. Rekombinante Expression

Die genetische Information einer putativen ANS aus *P. crispum* wurde in Hefe- und Bakterienzellen subkloniert und zur Expression gebracht. Dabei konnte in Biotransformationen mit transformierten, induzierten Bakterien mit Expressionssystemen ohne His-Tag die bekannte FLS-Nebenreaktion der ANS von Dihydroflavonolen zu Flavonolen detektiert werden (Welford et al., 2001; Turnbull et al., 2004). Die eingeschränkte, positive Expression und der Aktivitätsnachweis sind auf die bekannt schlechte Expression von rekombinanten ANS-Proteinen in aktiver Form mit His-Tag zurückzuführen. Saito et al. (1999) beschrieben in ihren Versuchen mit ANS aus *Perilla frutescens* eine schwache Aktivität des exprimierten Enzyms, die bei der Aufreinigung des Proteins ganz verloren ging. Diese Inaktivierung ist auf eine hohe Oxidationsempfindlichkeit und generelle Instabilität von 2-ODDn zurückzuführen, die bereits verschiedentlich beobachtet worden war (De Carolis und De Luca, 1994; Lukačín et al., 2000) und *in vitro* den Zusatz von Antioxidantien wie Ascorbat oder DTT erfordert (Myllylä et al., 1978; Myllyharju und Kivirikko, 1997; Prescott und Lloyd, 2000). Aufgrund dieser Enzymlabilität ist ein Aktivitätsnachweis von Extrakten der ANS mittels Enzymtest häufig nicht möglich. Alternativ wird die Aktivität, wie auch hier, durch Umsatz mit Biotransformation nachgewiesen (Yan et al., 2005+2007).

Zusätzlich weisen neben der Enzymlabilität auch die nativen Substrate und Produkte der Hauptreaktion von Leukoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen eine hohe Instabilität auf. Diese sind in Pflanzen lediglich in kaum messbaren Konzentrationen vorhanden, da es sich hierbei um Zwischenprodukte handelt, die direkt weiter umgesetzt werden (Saito et al., 1999; Yan et al., 2007). Aus diesem Grund ist die Umsetzung von Dihydroflavonolen zu Flavonolen als Nebenreaktion der ANS *in vitro* oft stabiler und lässt sich zuverlässiger nachweisen als die Hauptreaktion von Leukoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen. Jedoch

sind bei dem alleinigen Nachweis der Nebenreaktion, wie in den durchgeführten Versuchen, weitere Analysen zur eindeutigen Zuordnung des exprimierten Enzyms zur Gruppe der ANS oder FLS nötig.

### 3. Molekulargenetische Analyse der klonierten Sequenz

Die in Biotransformationen gemessene FLS-Aktivität kann ein Indiz für die Expression einer ANS sein und auch die klonierte cDNA und die daraus resultierende Polypeptid-Sequenz zeigten sehr hohe Identität zu bereits bekannten ANS-Sequenzen (Abbildung 61). Zur weiteren Klassifizierung der klonierten und heterolog exprimierten Sequenz aus *Petersilie* wurden weitere molekulargenetische Analysen durchgeführt.

Zunächst wurde mit Hilfe des genomischen Klons die Anzahl und die Position der Introns bestimmt und mit Intronmustern anderer 2-ODDn der Flavonoidbiosynthese verglichen, da dies auf die Funktion des Enzyms rückschließen lässt und ein Indiz für die Zuordnung von 2-ODDn ist (Prescott und John, 1996). Die klonierte Sequenz aus der *Petersilie* besitzt ein Intron an der dritten der vier möglichen Positionen (Abbildung 61). Dies spricht für ein ANS-Gen und war nach der hohen Identität im BLAST zu anderen ANS-Sequenzen zu erwarten, während für FLS-kodierende Gene die Introns in Position drei und vier zu erwarten sind (Prescott und John, 1996; Gebhardt et al., 2005).

Weitere Anhaltspunkte zur Klassifizierung des exprimierten Enzyms liefert die Analyse der Polypeptid-Sequenz. 2-ODDn enthalten viele konservierte Sequenz-Motive, die zur korrekten Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins und damit zur Funktion beitragen (Britsch et al., 1993; Lukačín und Britsch, 1997). Es wurde beschrieben, dass die katalytische Funktion von 2-ODDn meist durch das N-terminale Ende bestimmt wird, während das C-terminale Ende häufig über die Effizienz eines Enzyms entscheidet (Wellmann et al., 2004; Gebhardt et al., 2005). Vergleicht man die Alignments der hier untersuchten *Petersilien*-Sequenz mit den Sequenzen der ANS aus *A. thaliana* und der FLS aus *P. crispum* (Abbildung 62+63), ist anhand der N-terminalen Struktur und der Sequenzidentität klar erkennbar, dass es sich bei dem rekombinant exprimierten Enzym um eine ANS handelt. Für diese These spricht auch die Stammbaumanalyse, bei der die betrachtete Sequenz mit verschiedenen FLS- und ANS-Polypeptid-Sequenzen verglichen wurde (Abbildung 65). Hier wird die Sequenz nicht nur

überraschend strikt in das Cluster der ANS zugeordnet, sondern bildet auch gemeinsam mit der ANS-Sequenz aus *D. carota* eine Untergruppe, was die erwartete taxonomische Anordnung der entsprechenden Pflanzen wiedergibt.

Da weder *in vivo* (Biotransformationen) noch *in vitro* (Enzymextrakt) die Funktion als ANS nachgewiesen werden konnte, ist es möglich die genetische Information einer „defekten“ ANS kloniert und exprimiert zu haben, die nur noch FLS-Aktivität besitzt. Aus diesem Grund wurde ein Homologie-Modeling auf der Basis der kristallisierten ANS aus *A. thaliana* durchgeführt, um eventuelle Mutationen zu erkennen, die die Funktion des Enzyms verändern können. Das errechnete Modell des Petersilie-Enzyms (Abbildung 64) ergab vier Abweichungen, die die Aktivität eventuell beeinflussen könnten, wovon drei lediglich Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben sollten. Jedoch hat der Thr239:Ser243-Austausch in *PcANS* gegenüber *AtANS* (Abbildung 64D) wahrscheinlich einen Einfluss auf die Enzymreaktion, da dieser zu einer gewissen Instabilität des Eisen(II)ionen-Komplexes führen kann. Eine verminderte Bindung des Eisen(II)ions im reaktiven Zentrum des Enzyms würde die Reaktion stark behindern. Diese Veränderung würde sich auf die Reaktion von ANS und FLS gleich stark auswirken, so dass die Theorie der „defekten“ ANS nicht bestätigt werden konnte. Es könnte aber erklären, dass unter diesen eingeschränkten Reaktionsbedingungen die erschwerte nachweisbare Reaktion von Leukoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen außerhalb der Pflanze nicht detektiert werden kann. Diese bisher jedoch noch vage These muss, wie die exakten Positionierungen der Aminosäuren und deren Effekte durch weitere Versuche und anhand eigener Kristallisationsversuche bewiesen werden.

Zusammenfassend belegt die molekulargenetische Analyse, dass es sich bei der klonierten Sequenz mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um eine ANS handelt. Die Schwierigkeiten der Expression korrespondiert mit Erfahrungen bisheriger Untersuchungen, die ebenso feststellten, dass die ANS ein sehr empfindliches und aufgrund der leichten Oxidation aufwändig zu exprimierendes Enzym ist (De Carolis und De Luca, 1994; Lukačín et al., 2000; Myllylä et al., 1978; Prescott und Lloyd, 2000), dessen Aktivität sich auch aufgrund der Labilität von Substrat und Produkt nur schwer nachweisen lässt (Saito et al., 1999; Yan et al., 2007). Deshalb geben der Nachweis der FLS-Aktivität als ANS-Nebenreaktion in Biotransformationen zusammen mit den molekulargenetischen Analysen einen deutlichen Hinweis darauf, dass eine ANS aus *P. crispum* kloniert wurde.

#### 4. Semi-quantitative PCR

Die semiquantitative PCR (Abbildung 60) zeigt, dass viele Gene in der gestressten, roten Petersilie-Pflanze nur vermindert bzw. nicht transkribiert werden. Hierzu gehören beispielsweise die Gene der PAL, 4CL und FNS I deren Expression unter den gewählten Bedingungen in der gestressten Pflanze nicht mehr nachweisbar sind. Aber auch die mRNA des Startenzym der Flavonoidbiosynthese, die CHS, wird nach diesen Ergebnissen nur sehr vermindert gebildet. Im Vergleich dazu weist die ANS nur eine sehr leichte Minderung der Expression auf, während das Transkript der DFR erst bei Stress detektierbar und somit für die Bildung der Anthocyane ausschlaggebend ist. Diese Beobachtung der DFR-Induktion ist besonders erstaunlich, da auch die Gene sehr grundlegender Enzyme verschiedener Stoffwechselwege unter diesen für die Pflanze schlechten Vegetationsbedingungen nur unzureichend exprimiert werden. Möglicherweise werden unter diesen Bedingungen bereits vorhandene Flavanone oder Flavonole zur Synthese von Anthocyanidinen genutzt.

Die PCR erfasst semiquantitativ nur die Transkriptmengen, wohingegen die Enzymmenge unter Stress von der Enzym-Halbwertszeit abhängt bis die Pflanzen aufgrund der schlechten Wachstumsbedingungen zu Grunde gehen oder die Wachstumsbedingungen sich bessern. Diese Halbwertszeiten der Proteine wurden noch nicht weiter untersucht. Allein für die PAL aus *Petroselinum hortense* wurde bisher eine Halbwertszeit von 10 Stunden nachgewiesen (Hahlbrock, 1973; Hernández und Van Breusegem, 2010). Unter Beachtung der energetischen Rahmenbedingungen der Flavonoidbiosynthese und des Verhältnisses des benötigten Stickstoffes zu Kohlenstoff muss die Halbwertszeit von 2-ODDn auf mindestens 4 Stunden geschätzt werden, wobei die weitere Derivatisierung der Flavonoide noch nicht beachtet wurde (Hernández und Van Breusegem, 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die nachgewiesene Transkriptmenge zunächst keine Aussage über vorhandene Enzyme geben kann, aber eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass die Anthocyanidin- bzw. Anthocyan-Synthese erst unter Trockenstress einsetzt.

## 5. Vorteil der Bildung von Anthocyanen

Zuletzt bleibt jedoch noch die Frage offen, welche Vorteile sich für die Pflanze in der Stresssituation ergeben, Anthocyane zu bilden. Diese stressbedingte Induktion ist in Pflanzen nicht nur unter dem hier betrachteten Trockenstress zu beobachten, sondern wird in anderen Pflanzen allgemein unter osmotischem Stress beobachtet (Gollop et al., 2001; Xu et al., 2008). Durch ihre mehrfache Glycosylierung binden Anthocyanidine lösliche Zucker, die zunächst nicht mehr dem Energiehaushalt zur Verfügung stehen, welches aber die Konzentration gelöster Molekülen in der Zelle senkt. Der Vorteil könnte also der gesenkte osmotische Druck der Zelle sein. Zudem kann auf diese Weise ein Speicher z. Zt. nicht nutzbarer Assimilate angelegt werden, der bei Bedarf wieder abgerufen werden kann (Hernández und Van Breusegem, 2010). In früheren Veröffentlichungen wurde bestätigt, dass Anthocyane unter geringer UV-Bestrahlung und/oder hohen Temperaturen abnehmen, da durch die verminderte Photosyntheseleistung ein geringerer Anteil an löslichen Zuckern vorliegt (Ubi, 2004). Diese Beobachtung konnte auch in Versuchen mit Petersilie bestätigt werden, die unter Starklichtbestrahlung eine verstärkte Rotfärbung zeigte (V.1.1.). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anthocyan- und somit auch die Anthocyanidin-Biosynthese durch die Zuckerkonzentration in der Zelle reguliert wird, um diese möglichst physiologisch zu halten (Reay und Lancaster 2001; Ubi, 2004; Mori et al., 2007; Hernández und Van Breusegem, 2010). Bezugnehmend auf die Anthocyan-Biosynthese in Petersilie könnten die nötigen Enzyme auch hier durch diese Regulierung induziert werden. Aufgrund des hohen Wassermangels liegen alle gelösten Stoffe in der Pflanze in einer erhöhten Konzentration vor. Diese vermeidlich hohe Zuckerkonzentration induziert die Biosynthese der Anthocyane. Aus dieser Sicht scheint die Bildung der Anthocyane der Petersilie unter Trockenstress eine Fehlregulierung der Expression zu sein. Der zu erwartende Vorteil ist fraglich, könnte jedoch tatsächlich auf die Absenkung des osmotischen Drucks und somit auf die Verminderung der Zellschädigung abzielen.

## VIII. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen aus dem Flavonoidstoffwechsel - unter besonderer Berücksichtigung der FNS I, FLS und ANS - von *Equisetum arvense* und *Petroselinum crispum* untersucht.

*E. arvense* ist einer phylogenetisch sehr alten Gattung zuzuordnen und enthält eine große Zahl unterschiedlicher Flavonoide, die bereits gut erforscht sind (Saleh et al., 1971, Veit et al., 1995). Der Flavonoidstoffwechselweg in der Pflanze ist jedoch noch ungeklärt. In der hier vorgelegten Arbeit konnten im Enzymrohextrakt verschiedene 2-ODD-Aktivitäten nachgewiesen werden. Neben einer FHT- und FLS-Reaktion wurde zweifelsfrei auch eine FNS I-Aktivität bestimmt und konnte in Ansätzen charakterisiert werden. Dies ist ein erster Beweis, dass die Bildung von Flavonen mittels 2-ODD nicht allein auf die Familie der Apiaceae beschränkt ist. Der Versuch, die verantwortlichen Enzyme durch Proteinreinigung zu isolieren und funktionell zu charakterisieren, scheiterte aber an der Instabilität der Proteine. Ebenso konnte die schnell abnehmende katalytische Aktivität auch mit spezifischer Affinitätschromatographie nicht angereichert werden.

Hingegen konnten zwei 2-ODDn-cDNA-Sequenzen erfolgreich kloniert und exprimiert werden. Hierbei wurden Klonierungen mittels RT-PCR und cDNA-Bank-Screening durchgeführt. Da die exprimierten Proteine funktionell nicht mit den angebotenen Substraten identifiziert werden konnten, konnten diese evolutionär nicht verglichen werden. Auch mit Hilfe der phylogenetischen Analyse und aufgrund einer niedrigen Identität von 30 % zu anderen 2-ODDn konnte keine Aussage über die enzymatische Funktion getroffen werden. Die strukturelle Analyse der Polypeptid-Sequenzen und der genomischen Strukturen weist widersprüchliche Ergebnisse auf. Auf diese Weise kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den exprimierten cDNA-Sequenzen um 2-ODDn aus dem Flavonoidstoffwechsel handelt. Es ist dennoch wahrscheinlich, dass die klonierten Sequenzen für 2-ODDn kodieren.

Der zweite Untersuchungsgegenstand war die Flavonoidbiosynthese der Petersilie, bei der durch Trockenstress die Bildung roter Farbstoffe im Stängel erreicht werden konnte. Diese konnten als Anthocyane identifiziert werden, die ausschließlich in gestressten Pflanzen zu finden waren und als Glykoside der Aglyka Cyanidin und Paeonidin identifiziert werden konnten.

Als verantwortliches Enzym der Anthocyanidin-Synthese konnte die ANS aus *P. crispum* mittels RT-PCR und RACE-Technik erfolgreich kloniert und exprimiert werden. In Biotransformationen mit Bakterienkulturen konnte die für ANS bereits mehrfach nachgewiesene Nebenreaktion von Dihydroflavonolen zu Flavonolen (Welford et al., 2001; Turnbull et al., 2004) bestätigt werden. Die Hauptreaktion von Leukoanthocyanidinen zu Anthocyanidinen konnte jedoch weder in *in vitro* Enzymtests noch in Biotransformationen nachgewiesen werden.

Zur Abgrenzung von ANS-Sequenzen gegenüber FLS-Sequenzen wurde auf molekulargenetischer Ebene die genetische Information weiter untersucht und es wurden verschiedene Polypeptid-Strukturanalysen durchgeführt. Sowohl Alignments der Polypeptid-Sequenzen von *PcFLS* und *AtANS*, die Phylogenie-Analyse als auch die Untersuchung des genomischen Klons und Analyse der Intronlage bestätigten das Vorliegen einer ANS.

Weiter konnte mit Hilfe der semiquantitativen PCR gezeigt werden, dass Transkripte, die zunächst in ungestresst kultivierter Petersilie nachweisbar waren, in Petersilie, die unter Trockenstress kultiviert worden war, abnahmen oder sogar nicht mehr detektiert werden konnten. Lediglich das für die ANS kodierende Transkript konnte gleichbleibend detektiert werden, während das Transkript des DFR-Gens erst unter Trockenstress nachweisbar wurde. Dies bestätigte die *de novo* Synthese der Anthocyane auf Expressionsebene, die bereits durch die Inhaltsstoffanalytik angenommen worden war.



## IX. Referenzen

- Aherne, S.A., O'Brien, N.M., 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 507-514
- Akashi, T., Aoki, T., Ayabe, S., 1998. Identification of a cytochrome P450 cDNA encoding (2S)-flavanone 2-hydroxylase of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.; *Fabaceae*) which represents licodione synthase and flavone synthase II. *FEBS Letters*, 431, 287-290
- Almeida, J. R. M., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., de Vos, C. H. R., Deiml, B., Mourgues, F., Perrotta, G., Fischer, T. C., Bovy, A. G., Martens, S., Rosati, C., 2007. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Arch. Biochem. Biophys.* 465, 61-71
- Amado, N.G., Fonseca, B.F., Cerqueira, D.M., Moura Neto, V., Abreu, J.G., 2011. Flavonoids: Potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci.* 89, 545-554
- Ami, D., Natalello, A., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M., Doglia, S.M., 2005. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS* 579, 3433-3436
- Anzellotti, D., Ibrahim, R. K., 2000. Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: Affinity purification, characterization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 161-172
- Baldwin, J.E., Crouch, N.P., Fujishima, Y., Lee, M.H., MacKinnon, C.H., Pitt J.P.N., Willis, A.C., 1995. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase appears to display  $\alpha$ -ketoisocaproate dioxygenase activity in rat liver. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1255-1260
- Bäumler, S., 2006. Heilpflanzenpraxis heute (first edition). Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
- Barlow, J.N., Zhang, Z., John, P., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., 1997. Inactivation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase involves oxidative modifications. *Biochemistry* 36, 3563-3569
- Beckert, C., Horn, C., Schnitzler, J.-P., Lehning, A., Heller, W., Veit, M., 1997. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* 44, 275-283
- Borovok, I., Landman, O., Kreisberg-Zakarin, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G., 1996. Ferrous active site of isopenicillin N synthase: Genetic and sequence analysis of the endogenous ligands. *Biochemistry* 35, 1981-1987
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Britsch, L., Heller, W., Grisebach, H., 1981. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch.* 36c, 742-750
- Britsch, L., Grisebach, H., 1985. Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* 24, 1975-1976

- Britsch, L., Grisebach, H., 1986. Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. Eur. J. Biochem. 156, 569-577
- Britsch, L., 1990a. Purification of Flavanone 3 $\beta$ -Hydroxylase from *Petunia* hybrid: Antibody Preparation and Characterization of a Chemogenetically Defined Mutant. Arch. Biochem. Biophys. 267, 348-354
- Britsch, L., 1990b. Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent-desaturase. Arch. Biochem. Biophys. 282, 152-160
- Britsch, L., Ruhnau-Brich, B., Forkmann, G., 1992. Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* expression of flavanones 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida*. J. Biol. Chem. 267, 5380-5387
- Britsch, L., Dedio, J., Saedler, H., Forkmann, G., 1993. Molecular characterization of flavanones 3 $\beta$ -hydroxylases. Eur. J. Biochem. 217, 745-754
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K., 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 126, 524-535
- Bugg, T. D. H., 2001. Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O<sub>2</sub> activation. Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 550-555
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.d.L, Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chem. 113, 859-871
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159
- Christie P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V., 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. Planta 194, 541-549
- Clifton, I.J., Hsueh, L.-C., Baldwin, J.E., Harlos, K., Schofield, C.J., 2001. Structure of proline 3-hydroxylase – Evolution of the family of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. Eur. J. Biochem. 268, 6625-6636
- Clifton, I.J., McDonough, M.A., Ehrismann, D, Kershaw, N.J., Granatino, N., Schofield, C.J., 2006. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded  $\beta$ -helix fold proteins. J. Inorg. Biochem. 100, 644-669
- Coe, E.H., McCormick, S., Modena, S.A., 1981. White pollen in maize. J. Hered. 72, 318-320
- Crouch, N.P., Baldwin, J.E., Lee, M.-H., MacKinnon, C.H., Zhang, Z.H., 1996. Initial studies on the substrate specificity of soluble recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from rat liver. Bioorg. Med. Chem. Lett. 6, 1503-1506
- Crouch, N.P., Adlington, R.M., Baldwin, J.E., Lee, M.-H., MacKinnon, C.H., 1997. A mechanistic rationalisation for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). Tetrahedron 53, 6993-7010

- Cuadra, P., Harborne, J.B., 1996. Changes in epicuticular flavonoids and photosynthetic pigments as a plant response to UV-B radiation. *Z. Naturforsch.* 51c, 671-680
- Davies, K.M., Schwinn, K.E., 2007. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 143-218
- De Carolis, E., De Luca, V., 1993. Purification, Characterization, and Kinetic Analysis of a 2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Involved in Vindoline Biosynthesis from *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* 268, 5504-5511
- De Carolis, E., De Luca, V., 1994. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: Biochemical characterization. *Phytochemistry* 36, 1093-1107
- De Cooman, L., Everaert, E.S.W., Faché, P., Castele, K.V., van Sumere, C.F., 1992. Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry* 33, 1419-1426
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1
- Dixon, R.A., 1986. The phytoalexin response: Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol. Rev.* 61, 239-291
- Doan, L. X., Hassan, A., Lipscomb, S. J., Dhanda, A., Zhang, Z., Schofield, C. J., 2000. Mutagenesis Studies on the Iron Binding Ligands of Clavaminic Acid Synthase. *Biochem. Biophys. Research communications* 279, 240-244
- Ekiert, H., Gomólka, E., 2000. Coumarin compound in *Ammi majus* L. callus cultures. *Pharmazie* 55, 684-687
- Engbrecht, J., Brent, R., Kadervhai, M. A., 2001. Minipreps of plasmid DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Ed.: E.W. Harkins, John Wiley & Sons, Inc
- Elund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research* 24, 851-874
- Federolf, K., Alfermann, A. W., Fuss, E., 2007. Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. *Phytochemistry* 68, 1397-1406
- Feeny, P., Sachdev, K., Rosenberry, L., Carter, M., 1988. Luteolin 7-O-(6''-O-malonyl)- $\beta$ -D-glucoside and trans-chlorogenic acid: Oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly. *Phytochemistry* 27, 3439-3448
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M., 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 416, 123-129
- Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart Jr., C., Noel, J.P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 356-370

- Flagel, L.E., Wendel, J.F., 2009. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol.* 183, 557-564
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S.E., 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* 45, 7-18
- Fong, G.H., Takeda, K., 2008. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.* 15, 635-641
- Forkmann, G., 1991. Flavonoids as Flower Pigments: The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding* 106, 1-26
- Forkmann, G., Heller, W., 1999. Biosynthesis of flavonoids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Amsterdam, Elsevier, 713-748
- Gebhardt, Y., Witte, S., Forkmann, G., Lukačín, R., Matern, U., Martens, S., 2005. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family *Apiaceae*. *Phytochemistry* 66, 1273-1284
- Gebhardt, Y.H., Witte, S., Steuber, H., Matern, U., Martens, S., 2007. Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase by site-directed mutagenesis. *Plant Physiol.* 144, 1442-1454
- Gebhardt, Y.H., 2007. Molekularbiologische und Biochemische Untersuchungen zur Evolution der Flavonsynthase I in *Apiaceae*. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Gelsema, W.J., De Ligny, C.L., Roozen, A.M.P., Wilms, G.P., 1981. Optimal conditions for the coupling of aromatic amines to epoxy-activated Sepharose 6B. *J. Chromatogr.* 209, 363-368
- Gläbigen, W., Wray, V., Strack, D., Metzger, J.W., Seitz, H., 1992. Anthocyanins from cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Phytochemistry* 31, 1593-1601
- Gollop, R., Farhi, S., Perl, A., 2001. Regulation of the leucoanthocyanidins dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*. *Plant Sci.* 161, 579-588
- Goodarzi, H., Torabi, N., Najafabadi, H.S., Archetti, M., 2008. Amino acid and codon usage profiles: Adaptive changes in the frequency of amino acids and codons. *Gene* 407, 30-41
- Graefe, E.U., Veit, M., 1999. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* 6, 239-246
- Grayer, R.J., Harborne, J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry* 37, 19-42
- Grün, S., Frey, M., Gierl, A., 2005. Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: Distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66, 1264-1272
- Gutiérrez, R.M., Yescas, G., Walkowski, A., 1985. Diuretic activity of Mexican *Equisetum*. *J. Ethnopharmacol.* 14, 269-272

- Hahlbrock, K., Ebel, J., Ortmann, R., Sutter, A., Wellmann, E., Grisebach, H., 1971. Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension cultures of parsley (*Petroselinum hortense*). Biochim. Biophys. Acta 244, 7-15
- Hahlbrock, K., 1973. Regulation of the phenylalanine ammonia-lyase activity in cell- suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Apparent rates of synthesis and degradation. Eur. J. Biochem. 63, 137–145.
- Hahlbrock, K., Schröder, J., 1975. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Arch. Biochem. Biophys. 166, 47-53
- Hahlbrock, K., Grisebach, H., 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 105-130
- Halbwirth, H., Fischer, T. C., Schlangen, K., Rademacher, W., Schleifer, K.-J., Forkmann, G., Stich, K., 2006. Screening for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: Flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase and flavonol synthase. Plant sci. 171, 194-205
- Hansen, R.K., Oesterreich, S., Lemieux, P., Sarge, K.D., Fuqua, S.A., 1997. Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239, 851-856
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 1971. Flavonoid patterns in the fruits of the umbelliferae. Phytochemistry 11, 1741-1750
- Harborne, J.B., 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochem. Syst. Ecol. 27, 335-368
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55, 481-504
- Haribal, M., Renwick, J.A.A., 1996. Oviposition stimulants for the Monarch butterfly: flavonol glycosides from *Asclepias curassavica*. Phytochemistry 41, 139-144
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 68, 2831-2846
- Hedden, P., Phillips, A.L., 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. Trends Plant Sci. 5, 523-530
- Hegg, E. L., Que, L., 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad – an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. Eur. J. Biochem. 250, 625-629
- Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Seppänen, P., Teeri, T. H., 1992. Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. *Regina* (Compositae). Plant Mol. Biol. 22, 183-193
- Hernández, I., Van Breusegem, F., 2010. Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's Swiss army knife? Plant Sci. 179, 297-301

- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011
- Hertog, M.G., Geskens, E.J.M., Kromhout, D., 1997. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk: ten year follow-up of the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 349, 699
- Hirner, A.A., Veit, S., Seitz, U., 2001. Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-A-irradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Sci.* 161, 315-322
- Hoffmann, F., van den Heuvel, J., Zidek, N., Rinas, U., 2004. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 235-241
- Hughes, A.L., 2002. Adaptive evolution after gene duplication. *Trends Genet.* 18, 433-434
- Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Villi, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., Patton, S., Malinski, T., 1998. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br. J. Surg.* 85, 1080-1085
- Ikemura, T., 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* 2, 13-34
- Iturriagagoitia-Bueno, T., Gibson, E.J., Schofield, C.J., John, P., 1996. Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by 2-oxoacids. 1996. *Phytochemistry* 43, 343-349
- Jacobs, M., Rubery, P.H., 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241, 346-349
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1989. *Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden (Band 1a)*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp 277–280
- Kandaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., Lee, M.T., 2005. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* 19, 895-909
- Kane, J.F., Hartley, D.L., 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 6, 95-101
- Kim, J.H., Nonaka, G.-I., Fujieda, K., Uemoto, S, 1989. Anthocanidin malonylglucosides in flowers of *hibiscus syriacus*. *Phytochemistry* 28, 1503-1506
- Kim, H.J., Tsoy, I., Park, J.M., Chung, J.I., Shin, S.C., Chang, K.C., 2006. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- $\alpha$ -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- $\kappa$ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damage incurred by ischemia and reperfusion. *FEBS Lett.* 580, 1391-1397
- Kivirikko, K.I., Majamaa, K., 1985. Synthesis of collagen: chemical regulation of post-translational events. *Ciba Found Symp.* 114, 34-64
- Knott, J. M., 2004. Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel. Dissertation Technische Universität München

- Kobuchi, H., Roy, S., Sen, C.K., Nguyen, H.G., Packer, L., 1999. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J. Physiol.* 277, C403-C411
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16, 123-132
- Kondo, A., Blanchard, J.S., England, S., 1981. Purification and properties of calf liver  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 338-346
- Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawn, A., Kawai, T., Hirotooshi, T., Goto, T., 1992. Structural basis of blue color development in flower petals of *Commelina communis*. *Nature* 358, 515-518
- Kreydiyyeh, S.I., Usta, J., 2002. Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *J. Ethnopharm.* 79, 353-357
- Kubitzki, K., 1987. Phenylpropanoid metabolism in relation to land plant origin and diversification. *J. Plant Physiol.* 131, 17-24
- Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H., 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* 38, 133-142
- Kurowska, E.M., Borradaile, N.M., Spence, J.D., Carrol, K.K., 2000a. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutr. Res.* 20, 121-9
- Kurowska, E.M., Spence, J.D., Jordan, J., Wetmore, S., Freeman, D.J., Piché, L.A., Serratore, P., 2000b. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1095-1100
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-684
- Lange, T., Hedden, P., Graebe, J.E., 1993. Gibberellin biosynthesis in cell-free extracts from developing *Cucurbita maxima* embryos and the identification of new endogenous gibberellins. *Planta* 189, 350-358
- Lange, T., Schweimer, A., Ward, D.A., Hedden, P., Graebe, J.E., 1994. Separation and charakterisation of three 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases from *Cucurbita maxima* L. endosperm involved in gibberellin biosynthesis. *Planta* 195, 98-107
- Lee, L.-Y., Kononov, M. E., Basuner, B., Frame, B. R., Wang, K., Gelvin, S. B., 2007. Novel plant transformation vectors containing the superpromotor. *Plant Physiol.* 145, 1294-1300
- Lemus, I., Garcia, R., Erazo, S., Peña, R., Parada, M., Fuenzalida, M., 1996. Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea: evaluation in healthy volunteers. *J. Ethnopharmacol.* 54, 55-58
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2010. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 125, 288-306
- Lindman, C.A.M., Bilder ur Nordens Flora (1901-1905) <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/lindman/515.jpg>

- Liu, L., Gitz, D.C., McClure, J.W., 1995. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiol. Plant* 93, 725-733
- Loew, D., Blume, H., Dingeramn, T., 1999. V Phytopharmaka. Forschung und klinische Anwendung. Hrsg. Loew, D., Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH & Co. KG, Darmstadt, ISBN 3-7985-1203-5, 51-59
- Lukačín, R., Britsch, L., 1997. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrid* flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 249, 748-757
- Lukačín, R., Gröning, I., Schlitz, E., Britsch, L., Matern, U., 2000. Purification of recombinant flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of the primary site of proteolytic degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 364-370
- Lukačín, R., Matern, U., Junghanns, K.T., Heskamp, M.-L., Britsch, L., Forkmann, G., Martens, S., 2001. Purification and Antigenicity of Flavone Synthase I from Irradiated Parsley Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 393, 177-183
- Lukačín, R., Wellmann, F., Britsch, L., Martens, S., Matern, U., 2003. Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. *Phytochemistry* 62, 287-292
- Lynch, M., Force, A., 1999. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-473
- MacMillan, J., 1997. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat. Prod. Rep.* 14, 221-244
- Majamaa, K., Hanauske-Abel, H.M., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., 1984. The 2-Oxoglutarate binding site of prolyl 4-hydroxylase – Identification of distinct subsites and evidence for 2-oxoglutarate decarboxylation in a ligand reaction at the enzyme-bound ferrous ion. *Eur. J. Biochem.* 138, 239-245
- Manual: Affinity Chromatography, Principles and Methods. Pharmacia, Uppsala
- Markham, K.R., Moore, N.A., Porter, L.J., 1977. Changeover in flavonoid pattern accompanying reproductive structure formation in a bryophyte. *Phytochemistry* 17, 911-913
- Martens, S., Forkmann, G., 1998. Genetic control of flavone synthase II activity in flowers of *Gerbera* hybrids. *Phytochemistry* 49, 1953-1958
- Martens, S., Forkmann, G., Britsch, L., Matern, U., Lukačín, R., 2001. Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* 58, 43-46
- Martens, S., Forkmann, G., Britsch, L., Wellmann, F., Matern, U., Lukačín, R., 2003. Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate dependent dioxygenases in parsley. *FEBS Letters* 544, 93-98
- Martens, S., Mithöfer, A., 2004. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66, 2399-2407
- Martens, S., Preuss, A., Matern, U., 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* 71, 1040-1049



- Martin, C., Gerats, T., 1993. The control of pigment biosynthesis during petal development. *Plant Cell* 5, 1253-1264
- Martínez, A.E., Favret, E.A., 1990. Anthocyanin synthesis and lengthening in the first leaf of barley isogenic lines. *Plant Sci.* 71, 35-43
- McNulty, J., Nair, J.J., Bollareddy, E., Keskar, K., Thorat, A., Crankshaw, D.J., Holloway, A.C., Khan, G., Wright, G.D., Ejim, L., 2009. Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. *Phytochemistry* 70, 2040-2046
- Middleton, E., Kandaswami Jr., C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751
- Mikanagil, Y., Saito, N., Yokoi, M., Tatsuzawa, F., 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae*, *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 887-902
- Miksch, M., Boland, W., 1996. Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plant (*Apium graveolens*). *Experientia* 52, 739-743
- Miura, H., Kitamura, Y., Ikenaga, T., Mizobe, K., Shimizu, T., Nakamura, M., Kato, Y., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y., 1998. Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry* 48, 279-283
- Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L.P., 1992. Biochemical complementation of chalcon synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 7213-7217
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K., 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* 58, 1935-1945
- Mutasa-Göttgens, E., Hedden, P., 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 60, 1979-1989
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 386-393
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., 1997. Characterization of the iron- and 2-oxoglutaratebinding sites of human prolyl 4-hydroxylase. *EMBO J.* 16, 1173-1180
- Myllylä, R., Kuutti-Savolainen, E.-R., Kivirikko, K.I., 1978. The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 441
- Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T., 2005. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chem.* 91, 389-394
- Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H., 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1787-1790

- Nakajima, J., Tanaka, Y., Yamazaki, M., Saito, K., 2001. Reaction mechanism from Leucoanthocyanidin to Anthocyanidin 3-Glucoside, a key reaction for coloring in Anthocyanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 25797-25803
- Ness, A.R., Powles, J.W., 1997. Fruits and vegetables and cardiovascular disease: a review. *Int. J. Epidemiol.* 26, 1-13
- Nature Publishing Group, 2005. Rapid amplification of 5' complementary DNA ends (5' RACE). *Nature Methods* 2, 629-630
- Ngaki, M.N., Louie, G.V., Philippe, R.N., Manning, G., Pojer, F., Bowman, M.E., Li, L., Larsen, L., Wurtele, E.S., Noel, J.P., 2012. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature* 485, 530-533
- Ober, D., 2005. Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 10, 444-449
- Ober, D., 2010. Gene duplications and the time thereafter – examples from plant secondary metabolism. *Plant Biol.* 12, 570-577
- Ogata, A., Tsuruga, A., Matsuno, M., Mizukami, H., 2004. Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the two final cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. *Plant Biotech.* 21, 393-396
- Oh, H., Kim, D.-H., Cho, J.-H., Kim, Y.-C., 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol.* 95, 421-424
- Opdyke, D.L.J., 1975. Parsley seed oil. *Food Cosmet. Toxicol.* 13, 897-898
- Ormrod, D.P., Landry, L.G., Conklin, P.L., 1995. Short term UV-B radiation on ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation of flavonoid-deficient *Arabidopsis* mutants. *Physiologia Plantarum* 93, 602-610
- Owens, D.K., Alerding, A.B., Crosby, K.C., Bandara, A.B., Westwood, J.H., Winkel, B.S.J., 2008. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1046-1061
- Pallett, K.E., Little, J.P., Sheekey, M., Veerasekaran, P., 1998. The mode of action of Isoxaflutole. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 113-124
- Peer, W.A., Murphy, A.S., 2006. Chapter 9 Flavonoids as signal molecules – Targets of Flavonoid Action. In: Peer, W., Murphy, A. (Eds.), *The science of flavonoids*. Springer, 239-268
- Peterek, S., 2004. Phenolische Inhaltsstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen den Feuerbrand. Dissertation Technische Universität München
- Peters, N.K., Frost, J.W., Long, S.R., 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodule genes. *Science* 233, 917-1008

- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., Jerala, R., 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 530-536
- Prescott, A.G., John, P., 1996. Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 245-271
- Prescott, A.G., Lloyd, M., 2000. The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat. Prod. Rep.* 17, 367-383
- Prescott, A.G., Stamford, N.P.J., Wheeler, G., Firmin, J.L., 2002. In vitro properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 60, 589-593
- Preuss, A., Stracke, R., Weisshaar, B., Hillebrecht, A., Matern, U., Martens, S., 2009. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS Lett.* 583, 1981-1986
- Ranelletti, F.O., Maggiano, N., Serra, F.G., Ricci, R., Larocca, L.M., Lanza, P., Scambia, G., Fattorossi, A., Capelli, A., Piantelli, M., 2000. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int. J. Cancer* 85, 438-445
- Reuber, S., Bornman, J.F., Weisenböck, G., 1996. A flavonoid mutant of barley exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in primary leaves. *Plant Cell Environ.* 19, 593-599
- Rohde, B., 2008. Acridonbiosynthese in *Ruta graveolens* L.: Molekularbiologie und Biochemie der Anthranilat N-Methyltransferase. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effect and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34
- Ryle, M. J., Hausinger, R. P., 2002. Non-heme iron oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 193-201
- Ryan, K.G., Swinny, E.E., Winefield, C., Markham, K.R., 2001. Flavonoid and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. *Z. Naturforsch.* 56c, 745-754
- Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K.R., Winefield, C., 2002. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 59, 23-32
- Saito, K., Kobayashi, M., Zhizhong, G., Yohikazu, T., Yamazaki, M., 1999. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *Plant J.* 17, 181-189
- Saleh, N.A.M., Majak, W., Towers, G.H.N., 1972. Flavonoids of *Equisetum* species. *Phytochemistry* 11, 1095-1099
- Schijlen, E.G.W.M., de Vos, C.H.R., van Tunen, A.J., Bovy, A.G., 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65, 2631-2648
- Schlaman, H.R.M., Okker, R.J.H., Lugtenberg, B.J.J., 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in *Rhizobia*. *J. Bacteriol.* 174, 5177-5182
- Schlicher, H., Kammerer, S., Wegener, T., 2007. Leitfaden Phytotherapie, 3. Auflage. Elsevier GmbH München

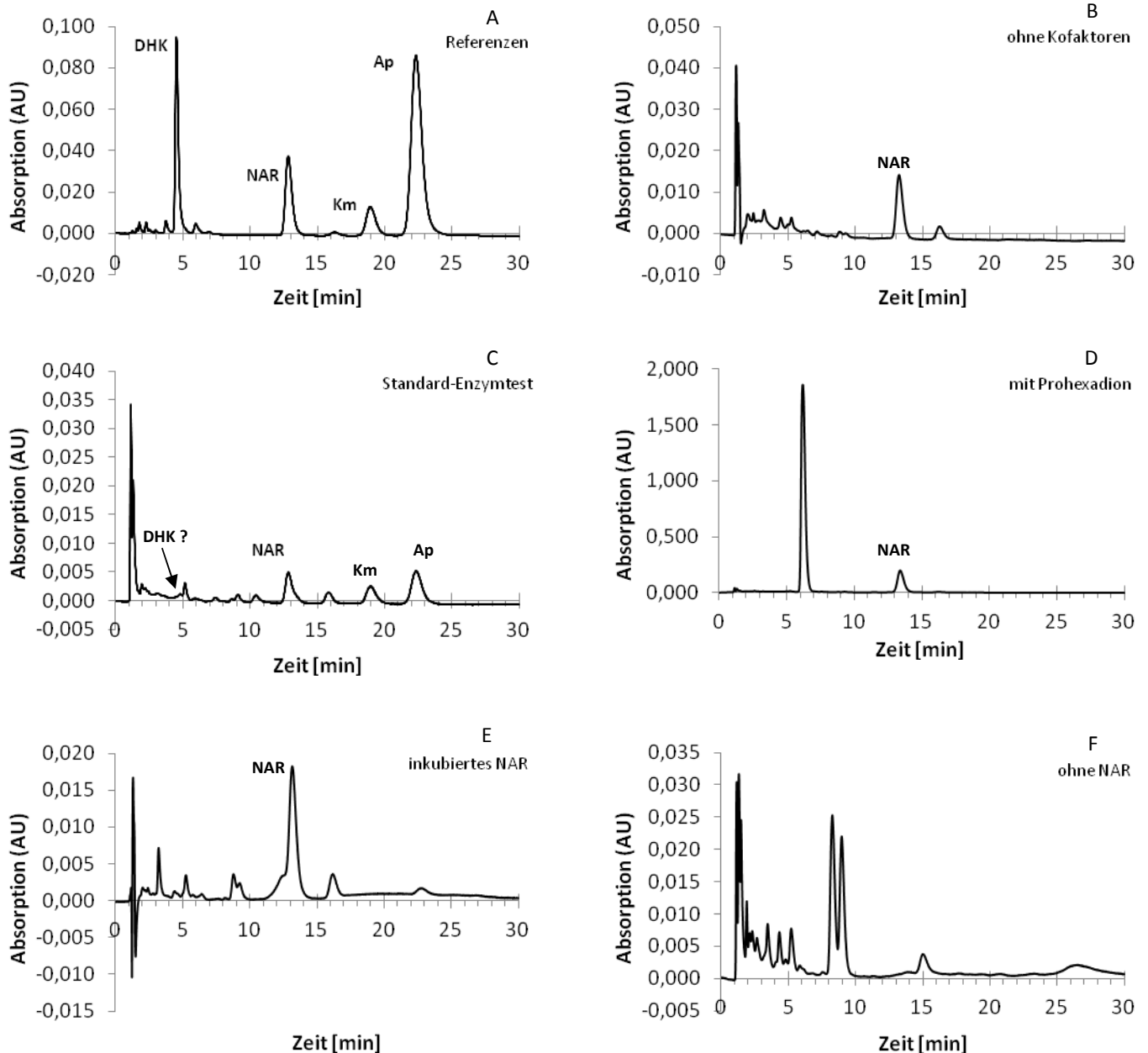
- Schmelzer, E., Jahnen, W., Hahlbrock, K., 1988. In situ localization of light-induced chalcon synthase mRNA, chalcone synthase and flavonoid endproducts in epidermal cells of parsley leaves. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 2989-2993
- Schröter, H., Heiss, C., Spencer, J.P.E., Keen, C.L., Lupton, J.R., Schmitz, H.H., 2010. Recommending flavonols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. *Mol. Aspects Med.* 31, 546-557
- Schofield, C.J., Zhang, Z., 1999. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9, 722-731
- Schulze-Lefert, P., Becker-Andre, M., Schulz, W., Hahlbrock, K., Dangl, J.L., 1989. Functional architecture of the light-responsive chalconesynthase promoter from parsley. *Plant Cell* 1, 707-714
- Shang, Y., Venail, J., Mackay, S., Bailey, P.C., Schwinn, K.E., Jameson, P.E., Martin, C.R., Davies, K.M., 2011. The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. *New Phytologist* 189, 602-615
- Sharp, P.M., Cowe, E., Higgins, D.G., Schields, D.C., Wolfe, K.H., Wright, F., 1988. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within species diversity. *Nucleic Acids Res.* 16, 8207-8211
- Sim, J., Wong, E., Chin, H.S., Sim, T.S., 2003. Conserved structural modules and bonding networks in isopenicillin N synthase related non-haem iron-dependent oxygenases and oxidases. *J. Mol. Catal. B. Enzym* 23, 17-27
- Skaltsa, H., Verykokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G., Manetas, Y., 1994. UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs in *Quercus ilex*. *Phytochemistry* 37, 987-990
- Smith, J.J., John, P., 1993. Activation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/carbon dioxide. *Phytochemistry* 32, 1381-1386
- Smith, J.J., Zhang, Z.H., Schofield, C.J., John, P., Baldwin, J.E., 1994. Inactivation of 1-aminocyclopropane-i-carboxylate (ACC) oxidase. *J. Exp. Bot.* 45, 521-527
- Stafford, H.A., 1991. Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol.* 96, 680-685
- Staniszewka, I., Królicka, A., Malinski, E., Lojkowska, E., Szafranek, J., 2003. Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzym Microb. Tech.* 33, 565-658
- Stevenson, P.C., Haware, M.P., 1999. Maackiain in *Cicer bijungum* associated with resistance to *Botrytis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 761-767
- Sutherland, O.R.W., Russell, G., Biggs, D.R., Lane, G.A., 1980. Insect feeding deterrent activity of phytoalexin isoflavonoids. *Biochem. Syst. Ecol.* 8, 73-75
- Sutter, A., Poulton, J., Grisebach, H., 1975. Oxidation of flavanones to flavone with cell-free extracts from young parsley leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 547-556

- Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M., 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jamonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep.* 18, 485-489
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599
- Thomé, O.W., Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885). [http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band3/tafel\\_052.html](http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band3/tafel_052.html)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354
- Turnbull, J.J., Nagle, M.J., Seibel, J.F., Welford, R.W.D., Grant, G.H., Schofield, C.J., 2003. The C-4 stereochemistry of leucocyanidin substrates for anthocyanidin synthase affects product selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3853-3857
- Turnbull, J.J., Nakajima, J.I., Welford, R.W.D., Yamazaki, M., Saito, K., Schofield, C.J., 2004. Mechanistic studies on three 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 1206-1216
- Ubi, B.E., 2004. External stimulation of anthocyanin biosynthesis in apple fruit. *JFAE* 2, 65-70
- Van der Meer, I.M., Stam, M., van Tunen, A.J., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R., 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility. *Plant Cell* 4, 253-262
- Veit, M., Beckert, C., Höhne, C., Bauer, K., Geiger, H., 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38, 881-891
- Wagner, H.; Bauer, R., 1999. *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe – 6., neu bearb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Waser, N.M., Price, M.V., 1983. Pollinator behavior and natural selection for flower colour in *Delphinium nelsonii*. *Nature* 302, 422-424
- Welford, R.W.D., Kirkpatrick, J.M., McNeill, L.A., Puri, M., Oldham, N.J., Schofield, C.J., 2005. Incorporation of oxygen into the succinate co-product of iron(II) and 2-oxoglutarate dependent oxygenases from bacteria, plants and humans. *FEBS Letters* 579, 5170-5174
- Welle, R., Schröder, G., Schiltz, E., Grisebach, H., Schröder, J., 1991. Induced plant responses to pathogen attack – Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63). *Eur. J. Biochem.* 196, 423-430
- Wellmann, E., 1974. UV dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parley. *FEBS Lett.* 51, 105-107
- Wellmann, F., Lukačín, R., Moriguchi, T., Britsch, L., Schiltz, E., Matern, U., 2002. Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *Eur. J. Biochem.* 269, 4134-4142

- Wellmann, F., Matern, U., Lukačín, R., 2004. Significance of C-terminal sequence elements for *Petunia* flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase activity. *FEBS Letters* 561, 149-154
- Williams, C.A., Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539-573
- Wilmouth, R. C., Turnbull, J. J., Welford, R. W. D., Clifton, I. J. C., Prescott, A. G., Schofield, C. J., 2002. Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10, 93-103
- Wisman, E., Harmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H., Weisshaar, B., 1998. Knock-Out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12432-12437
- Witte, S., Moco, S., Vervoort, J., Matern, U., Martens, S., 2009. Recombinant expression and functional characterisation of regiospecific flavonoid glucosyltransferases from *Hieracium pilosella* L. *Planta* 229, 1135-1146
- Wolf, E. 2007. Den Tag mit Phytos besser durchstehen. *Pharm. Z.*: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=3638>
- Wollenweber E. 1982. Flavones and flavonols. In: Harborne JB, Mabry TJ, eds. *The flavonoids: advances in research*. London: Chapman and Hall, 189–259
- Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S.H., Young, C.Y., 2001. Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 22, 409-414
- Xu, F., Cheng, H., Cai, R., Li, L.L., Chang, J., Zhu, J., Zhang, F.X., Chen, L.J., Wang, Y., Cheng, S.H., Cheng, S.Y., 2008. Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from *Ginkgo biloba* and its expression in abiotic stress responses. *Mol. Cells* 26, 536-547
- Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T., Monoda, Y., 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2185-2191
- Yan, Y., Li, Z., Koffas, M.A.G., 2008. High-Yield Anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 126-140
- Yan, Y., Chemler, J., Huang, L., Martens, S., Koffas, M.A., 2005. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3617-3623
- Zhang, Z., Schofield, C.J., Baldwin, J.E., Thomas, P., John, P., 1995. Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 307, 77-85
- Zhang, Z., Barlow, J.N., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., 1997. Metal-Catalyzed Oxidation and Mutagenesis Studies on the Iron(II) Binding Site of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase. *Biochemistry* 36, 15999-16007
- Zhang, Z., Ran, J.-S., Clifton, I.J., Schofield, C.J., 2004. Crystal structure and mechanistic implications of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase – the ethylene-forming enzyme. *Chem. Biol.* 11, 1383-1394

## X. Anhang

### 1. HPLC-Analytik zum Enzymtest *E. arvense*

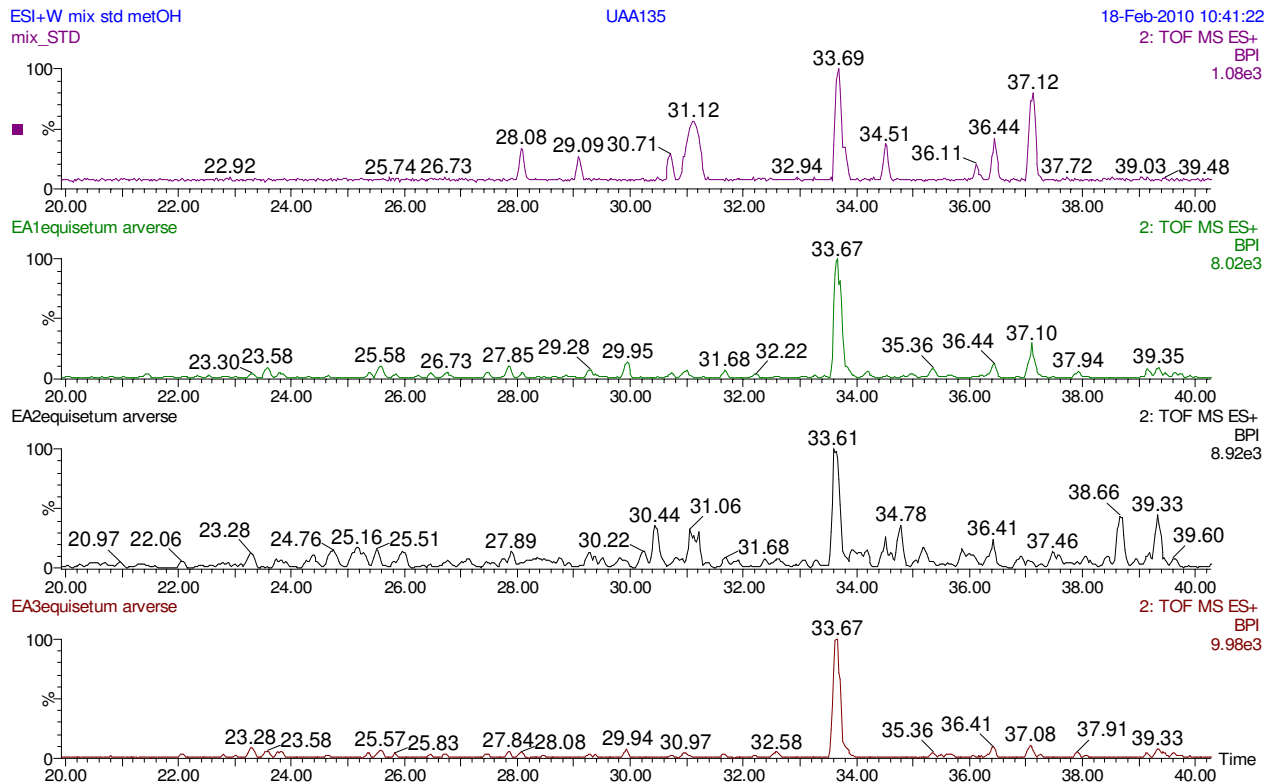


**Abbildung 66:**

Versuche zum Nachweis enzymatischer 2-ODD-Aktivität im Rohextrakt aus *E. arvense*. Als Substrate wurden NAR in Aktivitätstests unter Standardbedingungen in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels HPLC mit anschließender UV-Detektion aufgetrennt und ausgewertet. (A) zeigt die Auftrennung der authentischen Standards Ap, DHK, Km und NAR. Die übrigen Abbildungen (B) bis (F) zeigen Enzymtest-Inkubationen unter Standardbedingungen, wobei (C) das Chromatogramm eines Standardenzymtests darstellt. Dieser Test wurde ohne Kofaktoren (B), in Anwesenheit des Inhibitors Prohexadion (D) und ohne Substrat (F) wiederholt. Zusätzlich wurde eine Inkubation des Substrates NAR mit den Kofaktoren in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 ohne Pflanzenrohextrakt durchgeführt und der Ethylacetatextrakt analysiert (E).

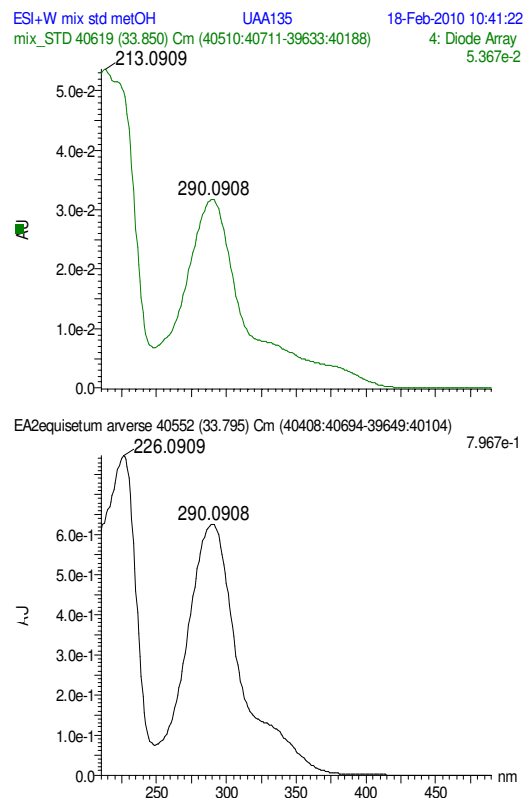
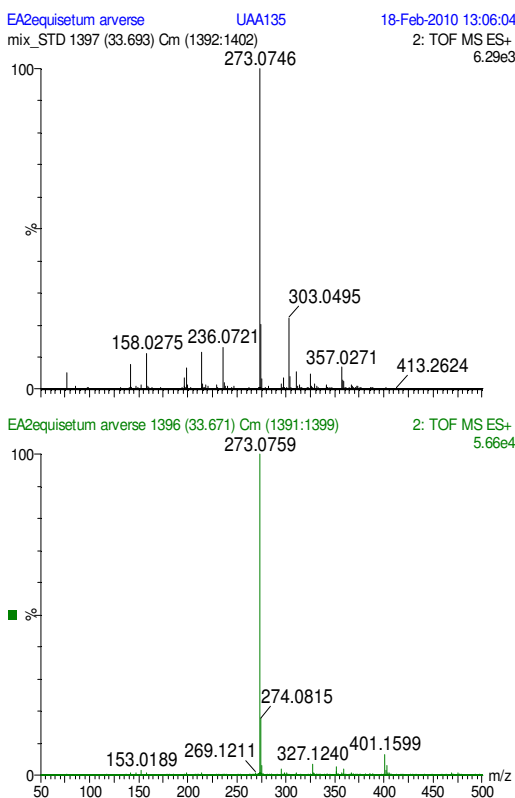
## 2. UPLC-MS-Daten zum Enzymtest *E. arvense*

A *E. arvense* (ESI+ W mode column HSST3) Laufzeit 63min



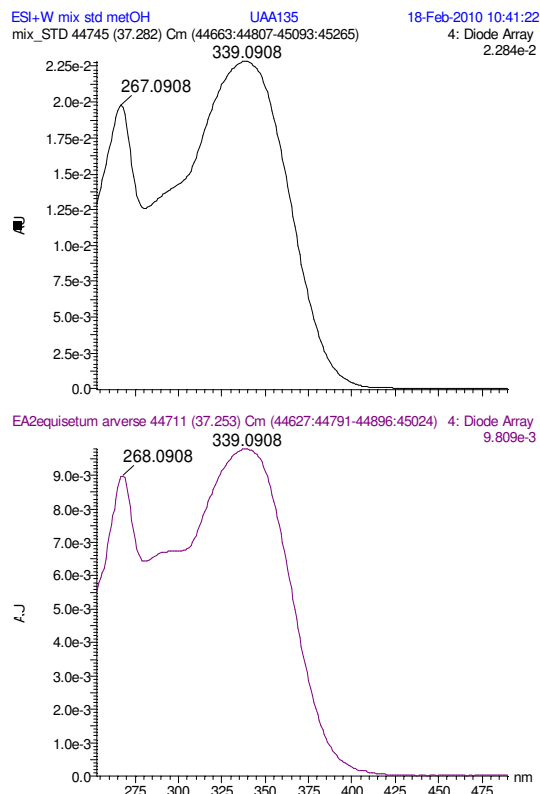
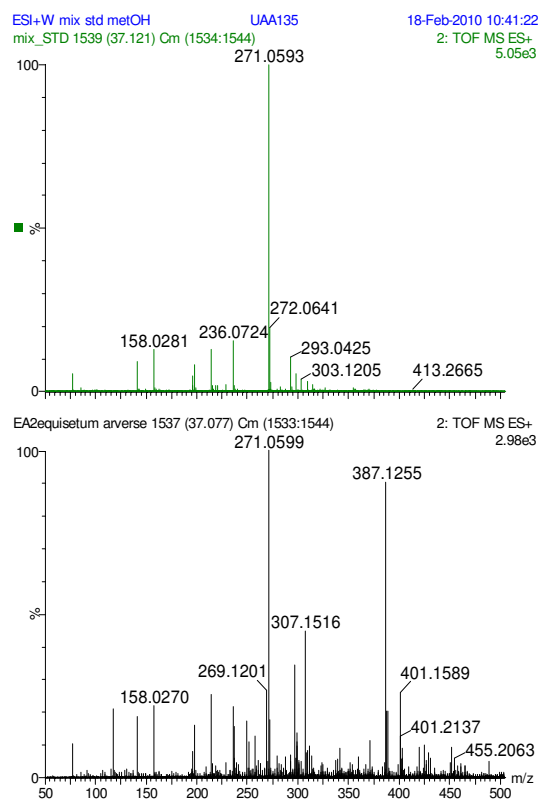
B

Naringenin M<sub>r</sub> 272,0685

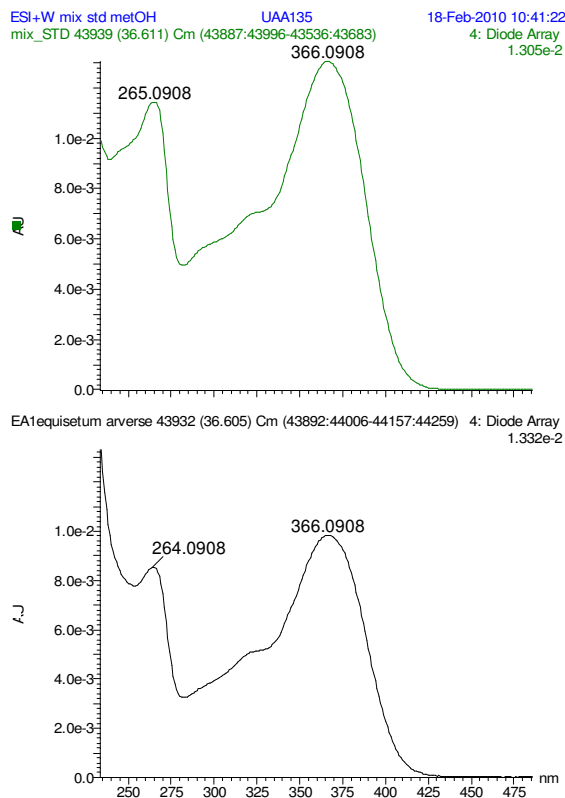
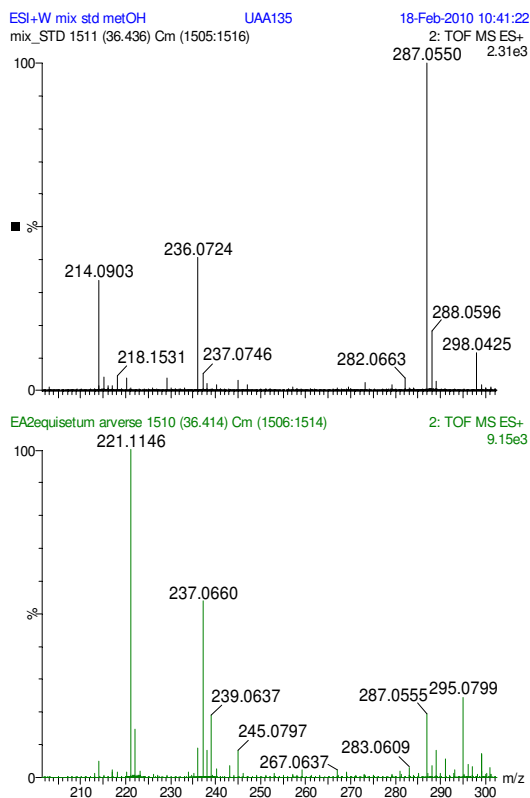




C

Apigenin M<sub>r</sub> 270,0528

D

Kaempferol M<sub>r</sub> 286,0477

E

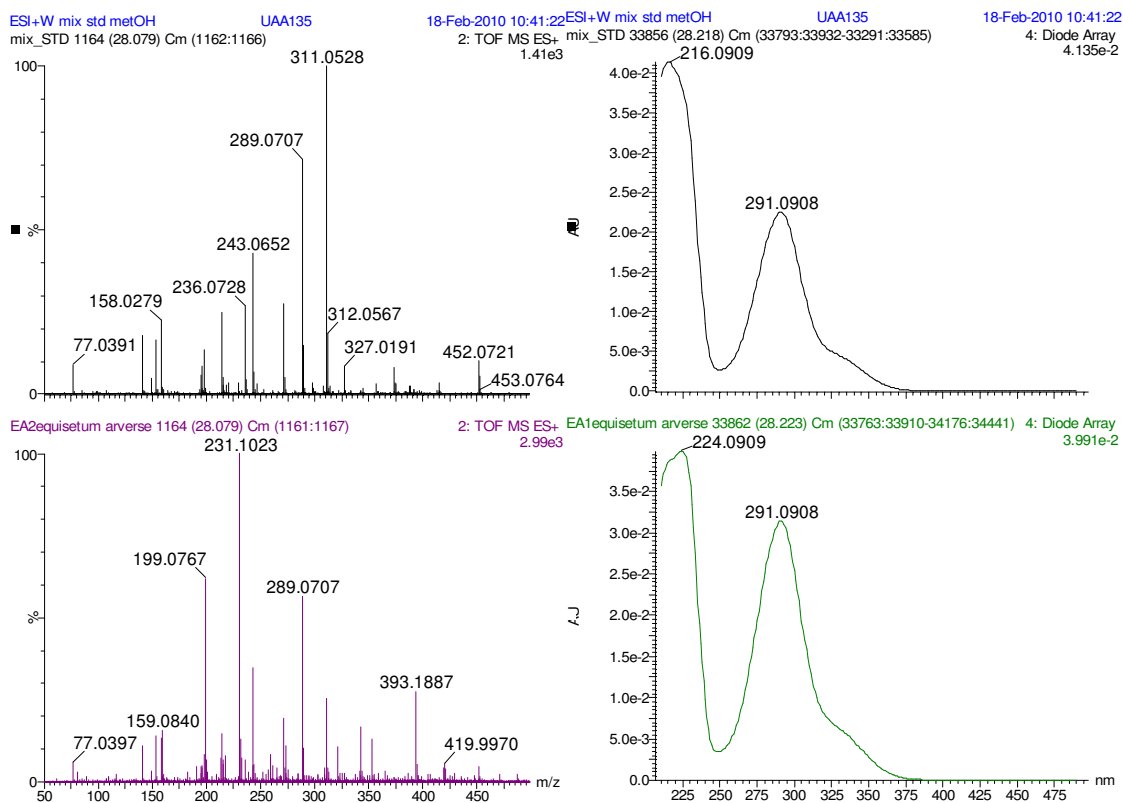
Dihydrokaempferol M<sub>r</sub> 288,0634

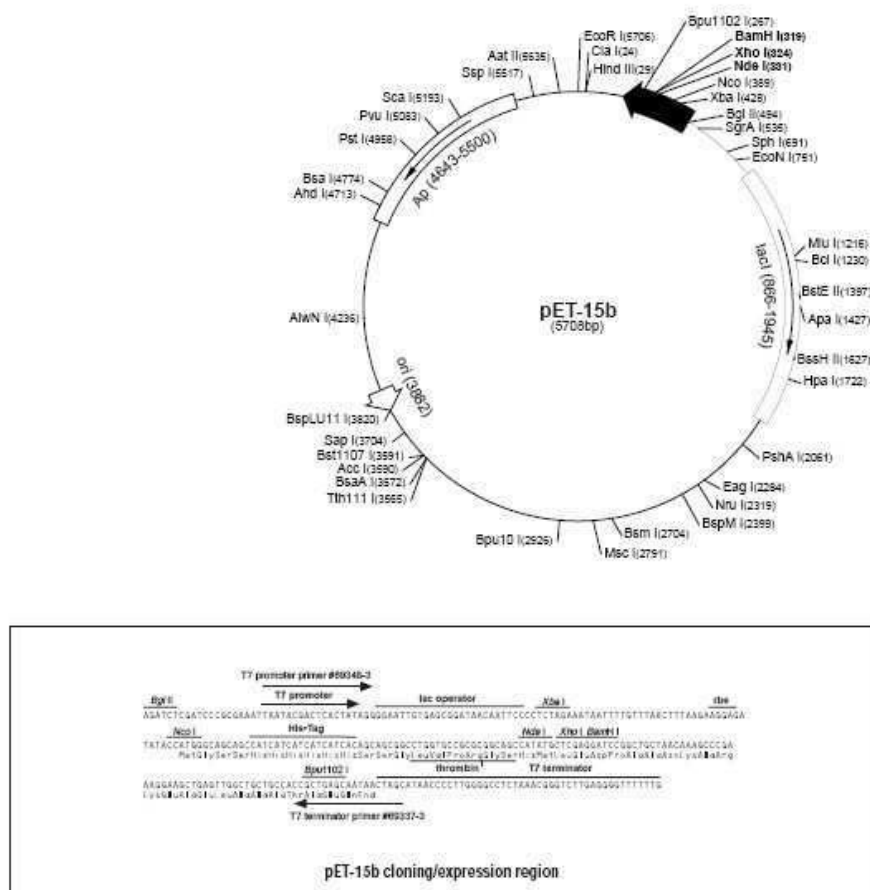
Abbildung 67:

Versuche zum Nachweis enzymatischer 2-ODD-Aktivität im Rohextrakt aus *E. arvense*.

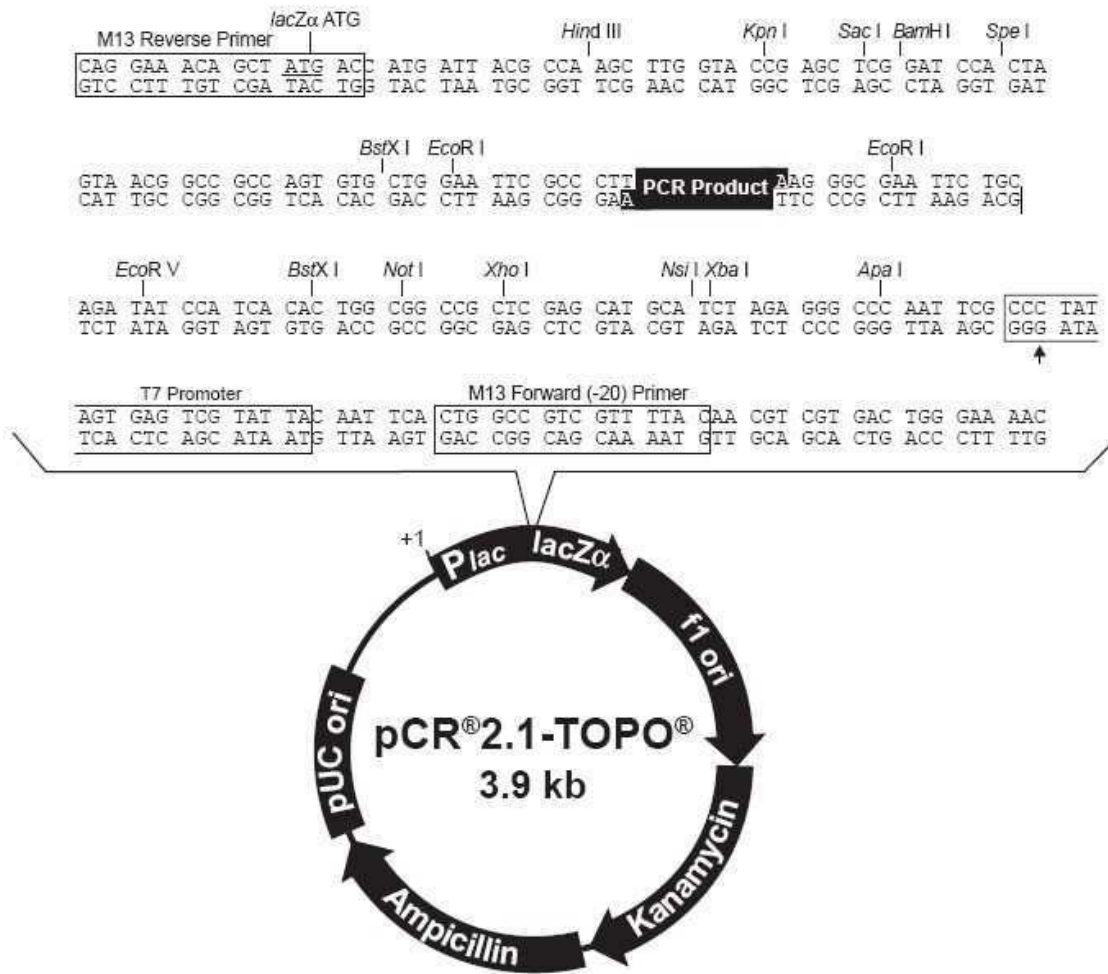
Als Substrate wurden NAR in Aktivitätstests unter Standardbedingungen in Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 eingesetzt. Die Inkubationen wurden durch Extraktion mit Ethylacetat beendet, mittels UPLC mit anschließender UV-Detektion und Massenspektroskopie aufgetrennt und ausgewertet. (A) zeigt im ersten Chromatogramm die Auftrennung der authentischen Standards Ap (37,12 min), DHK (28,08 min), Km (36,44 min) und NAR (33,69 min). Darunter sind entsprechende Chromatogramme des Testextraktes dargestellt. Die übrigen Abbildungen (B) bis (E) zeigen jeweils die Analysen der betrachteten Substanzpeaks in der Massenspektroskopie (links) und UV-Spektroskopie (rechts). Dabei sind die oberen Chromatogramme jeweils dem Standard zuzuordnen, während die unteren Chromatogramme die Analysen der Substanzen im Test wiedergeben.

### 3. Vektorkarten der Plasmide

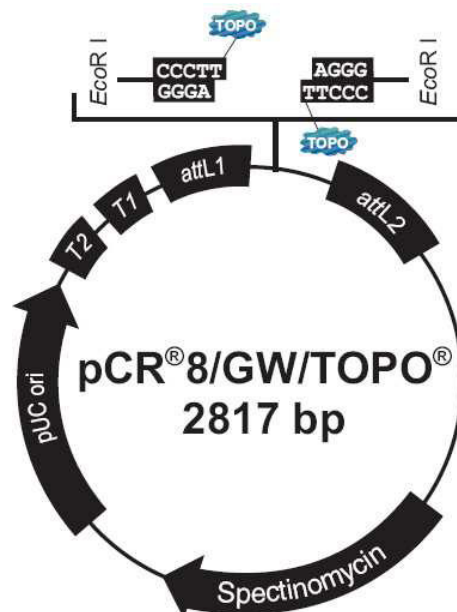
### 3.1 pET 15b (Novagen)



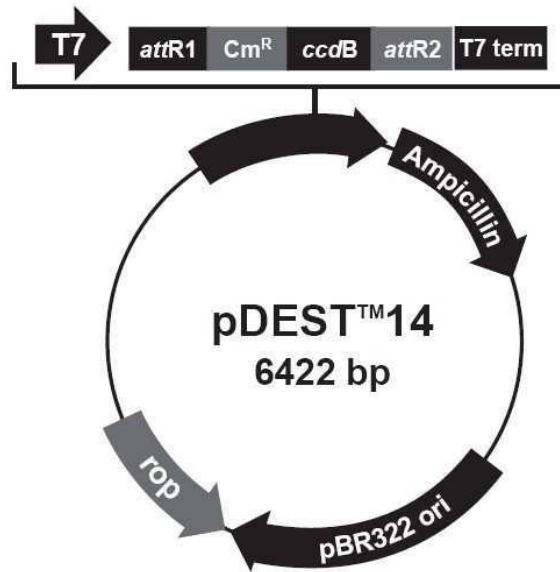
### 3.2 pCR 2.1 TOPO TA (Invitrogen)



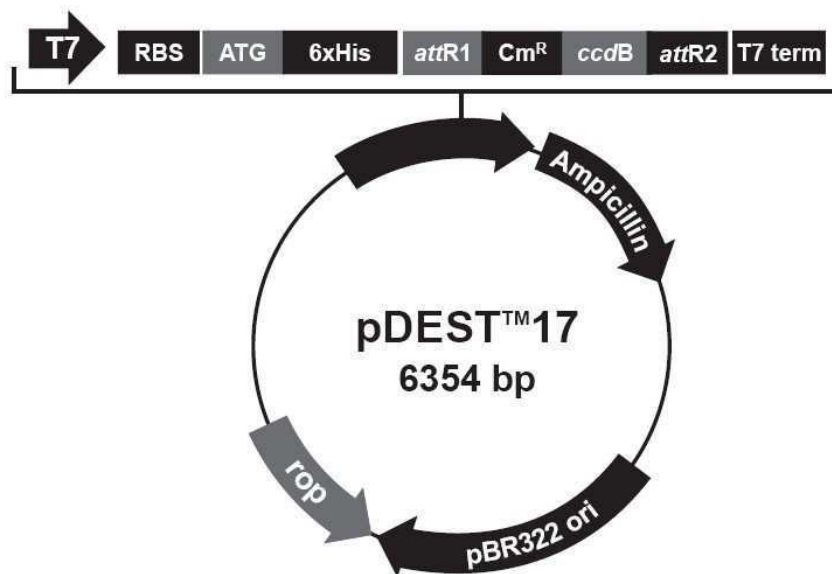
### 3.3 pCR 8 GW/TOPO TA (Invitrogen)



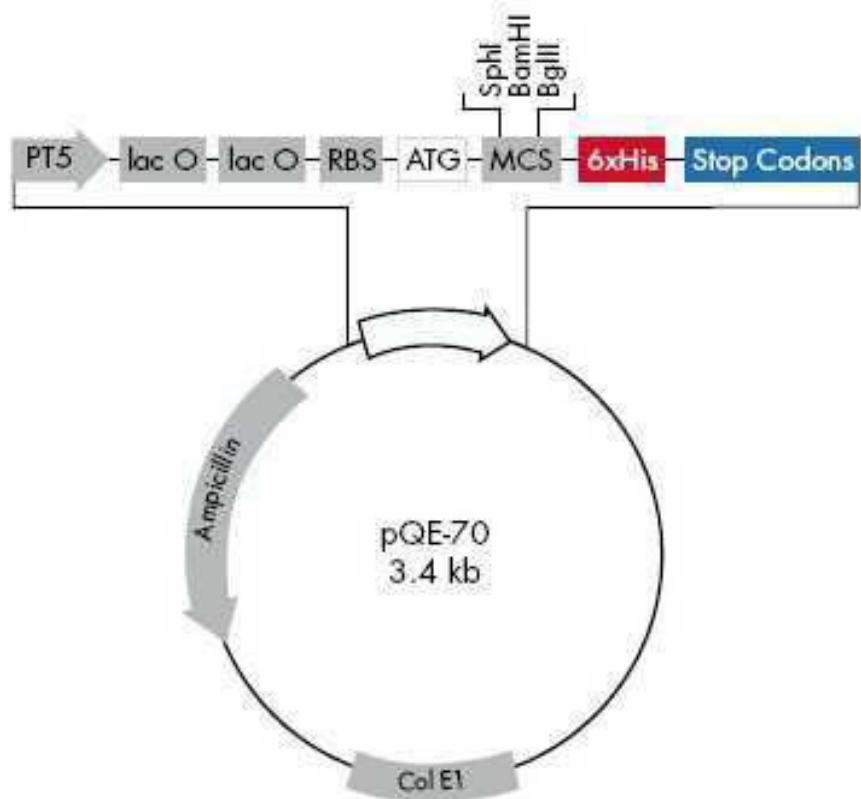
### 3.4 pDEST 14 (Invitrogen)



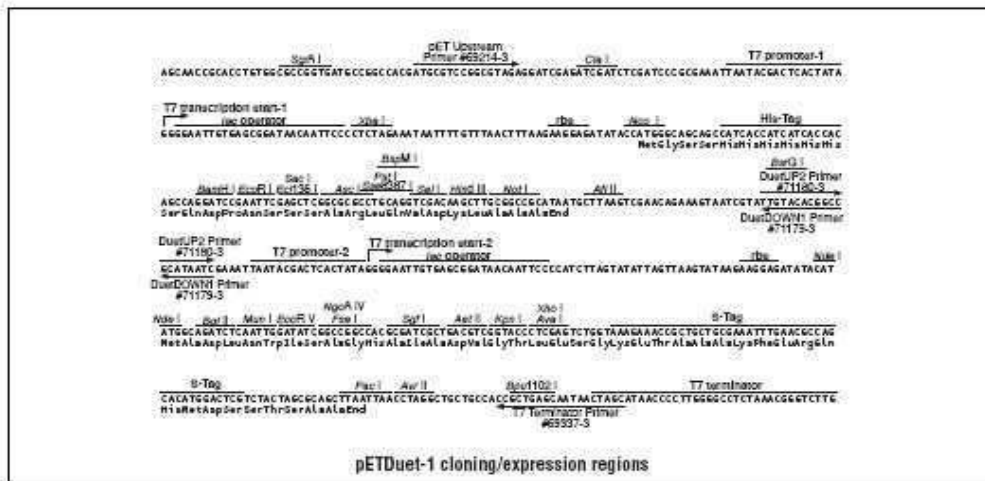
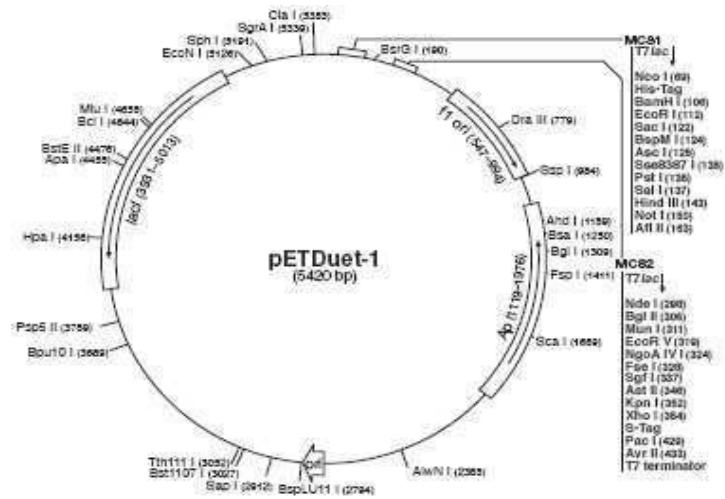
### 3.5 pDEST 17 (Invitrogen)



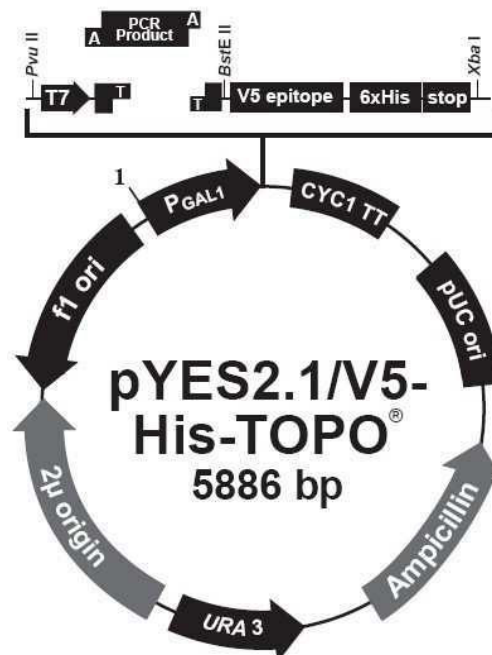
## 3.6 pQE 70 (Qiagen)



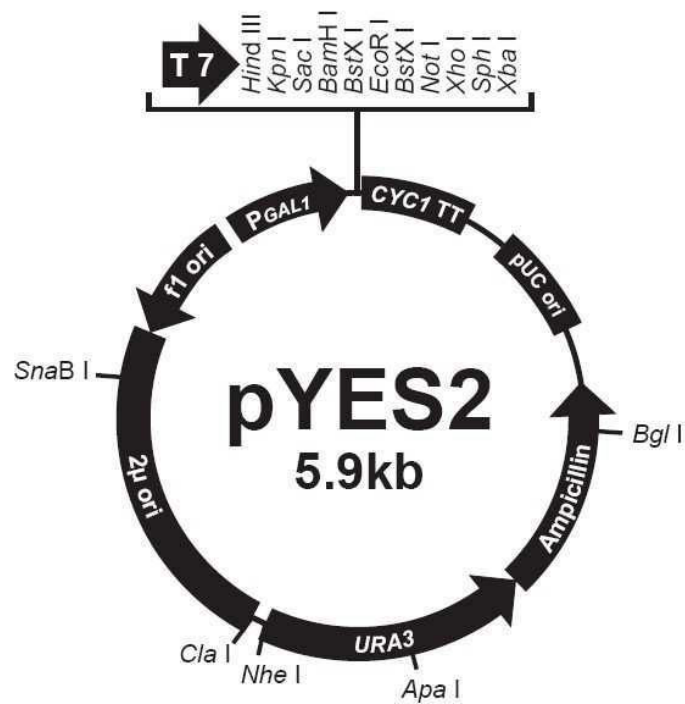
### 3.7 pET Duet-1 (Novagen)



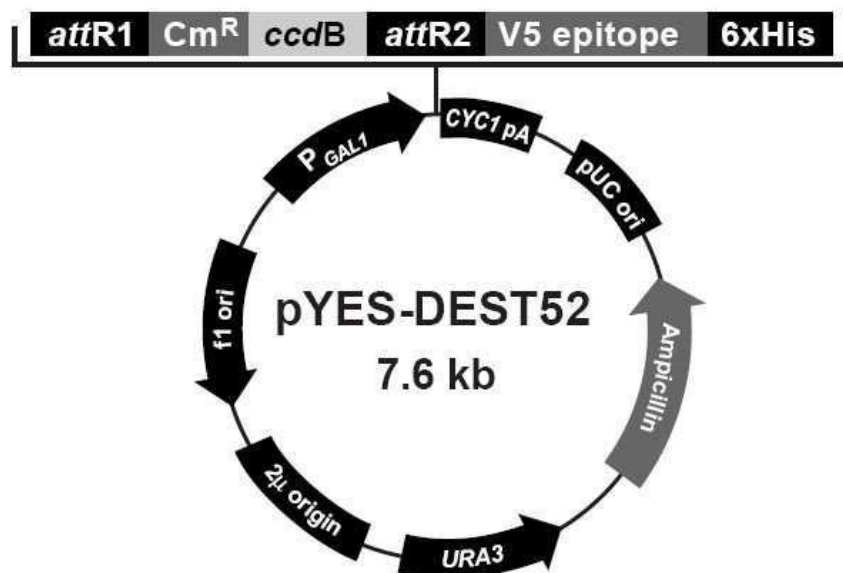
### 3.8 pYES 2.1 TOPO TA (Invitrogen)



### 3.9 pYES 2 (Invitrogen)



### 3.10 pYES-DEST 52 (Invitrogen)





#### 4. Klonierte cDNA-Sequenzen und translatierte Aminosäure-Sequenzen

```

Ea10DD1 atggcagaagtagttgctcccacattgaaatctattgggtgacctc
      M A E V V A P T L K S I G D L
46 tctgccgttttcctttttagcaaagaggttagatggcttcgtaatc
      S A V S F C S K E V D G F V I
91 cccaatgaatttggttctaccagaatccagtcgccccctctgttccc
      P N E F V L P E S S R P S V P
136 tatgactcatttcccgcatTTtagctgccagttattgatttgagc
      Y D S F P A F E L P V I D L S
181 gaattggataatgctgccagttgactaagatttgcaagaatgg
      E L D N A A K L T K I C E E W
226 ggtttcttccaagtagtaaatcacggagtggccgtgaaagtcctg
      G F F Q V V N H G V A V K V L
271 gagaggatggtagaaatcggccatgacttcttctccttacctact
      E R M V E I G H D F F S L P T
316 catgaaaaggagaaaggtagtatctcttacatgaatggctatgg
      H E K E K G S I S Y M N G Y G
361 gctaagcaaattaacttttggttaggaactccatgggtggaaggc
      A K Q I N F G L G T P W V E G
406 ctaacgtttcccatcttccggagagcaatatcgagacctttgag
      L T F P I L P E S N I E T F E
451 gccaggatatggcctcttggtaatcctcacttttcgcgaaaccata
      A R I W P L G N P H F R E T I
496 tacgaattcgcaagggaattagaatcacttgaagacaccgttctg
      Y E F A R E L E S L E D T V L
541 caactcttagccatgggcttgggacttgaatcaccggatttcttt
      Q L L A M G L G L E S P D F F
586 agtaaacatttgaagagtgggagtacgaccaaagggtgtacatttc
      S K H L K S G S T T K G V H F
631 aactactaccgcgatgtccagatccatccaaggtagggcgcg
      N Y Y P P C P D P S K V L G A
676 ctccccacactgatcctagtcttttaacgggtcctcttccaagac
      L P H T D P S L L T V L F Q D
721 aaagtaagcgggtcttcagatcatggctaaagatgggacttggctt
      K V S G L Q I M A K D G T W L
766 acgggttcagcacaaacccaacgggtctactcttctttgtgggcgat
      T V Q H K P N G L L F F V G D
811 attatgcagggatggagtaacaacggttttccggcagtgattcat
      I M Q G W S N N R F P A V I H
856 cgggttgcttgaataagaagataccgcgcctctcttttctccat
      R V A L N K K I P R L S F L H
901 gctactaatcctcccaaagatctaatacctagaacctcaccaaac
      A T N P P K D L I L E P S P N
946 ctgttgatgatgaacacctctgctctacaaaccattcacttat
      L V D D E H P L L Y K P F T Y
991 tctgggtatatgaagttttaaagccatcttcacgtgcaaaggcct
      S G Y M K F K S H L H V Q R P
1036 tatgatccaagcccatcgatgtctacgcaggattggccaataacc
      Y D A K P I D V Y A G L A N T
1081 cataacattccttgtgaggacctcattaa 1110
      H N I P C E D P H *

```

Ea20DD1 atgttgcccccttcacttcgcttcagtcatagatgttggaacc  
 M L P P F T S L P V I D V G P  
 46 cttgtggagaaatgcagtgatcctaactttgagaagaatgaagat  
 L V E K C S D P N F E K N E D  
 91 gcaatggatgttgtagacaaatcgattttgctgcaaagatagt  
 A M D V V R Q I D F A C K D S  
 136 ggcttcttttatgcaataggacatgggtgtgagagaatctctggtt  
 G F F Y A I G H G V R E S L V  
 181 gaatctgtgcaaatgtgagccgcgattactttcatcaaagtttt  
 E S V R N V S R D Y F H Q S F  
 226 gagaacaagatccaaataaagatgagcagcaagacgggttacagg  
 E N K I Q I K M S S K T G Y R  
 271 ggttatcagaaagtgggagaaaatgtcactaaagggcaacctgat  
 G Y Q K V G E N V T K G Q P D  
 316 ttgcatgaggctattgattactacaaggagcttgaaacctggacaa  
 L H E A I D Y Y K E L E P G Q  
 361 tacggagaccttgggtgctgtaatgtgtgctcccaatcagtggtccc  
 Y G D L G A V M C A P N Q W P  
 406 caatatcctccagagtttcagtcgttatggaagagtacattgag  
 Q Y P P E F Q S V M E E Y I E  
 451 gtcattgttaggtctttccgaaaactaatgcgtggcattgcattg  
 V M L G L S R K L M R G I A L  
 496 gctctgggtgggtcatcggtattctttgaaggagaaaaagcaggt  
 A L G G S S D S F E G E K A G  
 541 gatcctttttgggtcatgagggtgattggctatccaccacataca  
 D P F W V M R V I G Y P P H T  
 586 gtcaaggacaattcttagtagtgatgaagacaatggagtaggctgt  
 V K D N S S D E D N G V G C  
 631 ggagcccacacagattatgggttgctcacacttgatgaatcaggat  
 G A H T D Y G L L T L V N Q D  
 676 ccagatttatgtgctctgcagggttaagaaccaatcaggcgattgg  
 P D L C A L Q V K N Q S G D W  
 721 ataaatgctattccagtaaaggagcatttgggtgtcaatattggt  
 I N A I P V K G A F V V N I G  
 766 gatatgcttaagatttggagtaatggcctgtatcagtcacactg  
 D M L K I W S N G L Y Q S T L  
 811 catcgagttatcaacaacaatcccaaataccgggtttctgttcct  
 H R V I N N N P K Y R V S V P  
 856 ttcttttttagagccaaactttgatgtagtcgttgagcctttggaa  
 F F L E P N F D V V V E P L E  
 901 tcttgcaaaatgaaatctgccaacaatggggaaaccaaacagtt  
 S C K M K S A N N G E T K P V  
 946 gtttatgggtgagcatctagtgaagaaggtcctcacaattttctat  
 V Y G E H L V K K V L T N F Y  
 991 tga 993  
 \*

PcANS 1 atggtgacaaccacctcagtatctccaagagtagagaccctggct  
M V T T T S V S P R V E T L A  
46 ggaagtggaattcagctaattcccgaaagaatacgtgagggccgaaa  
G S G I Q L I P K E Y V R P K  
91 gatgaacttatcagcatcactaacatatatttgaagaagagaagaat  
D E L I S I T N I F E E E K N  
136 gttgaagggcctcaagtgcctataattgacatatctgacattggt  
V E G P Q V P I I D I S D I V  
181 tctgatgacacaattgtcagagaaaaatgccatgatatgatcaag  
S D D T I V R E K C H D M I K  
226 gaggtgccgtggaatgggggggttatgcaccttgtaaccatggg  
E A A V E W G V M H L V N H G  
271 atttcacgtgaacccatggatcgtggttagagtggcaggtcaatct  
I S R E P M D R V R V A G Q S  
316 ttttttgcgtgaaccaattggggagaaggagaagtatgcaaagatgat  
F F A E P I G E K E K Y A N D  
361 ccaggcaccggaatgattcaagggatggaagcaagctagccaac  
P G T G M I Q G Y G S K L A N  
406 aatgctagcggccagcttgaatgggaagactatttcttccacctt  
N A S G Q L E W E D Y F F H L  
451 gtttatcctgaggagaaagctgatttgtctctttggcctaagaga  
V Y P E E K A D L S L W P K R  
496 cccaggactatattccggcaacaagggagtatgcaaaggagtta  
P Q D Y I P A T R E Y A K E L  
541 agaggggctaacgacaaaagttactctctgcattatctttaggattg  
R G L T T K L L S A L S L G L  
586 ggacttgaagaaggaaggctagaaaaagaagttggcgggaatggag  
G L E G R L E K E V G G M E  
631 gagtactacttcaaatgaagatcaattactatcccaaatgtcct  
E L L L Q M K I N Y Y P K C P  
676 caaccagaactggctcttgggtggtgaagctcacaccgatgtgagt  
Q P E L A L G V E A H T D V S  
721 gcgctcagtttcatactccataatatggtgcccgggtctacaactc  
A L S F I L H N M V P G L Q L  
766 ttctatggaggcaagtgggtaaccgcaaaatgtgttccaaactcc  
F Y G G K W V T A K C V P N S  
811 attattgtacacatcggggacacccttgaaattttaagcaatggg  
I I V H I G D T L E I L S N G  
856 aagtataaaagtattcttcacaggggacttgtgaacaaggaaaag  
K Y K S I L H R G L V N K E K  
901 gttaggatttcttgggctattttctgtgagcctccaaaagagaag  
V R I S W A I F C E P P K E K  
946 attatttctaaagccactaccagagactgtaactgaggtgagcca  
I I L K P L P E T V T E A E P  
991 ccgctcttttctcctcgtacctttgctcagcatatggcacacaag  
P L F P P R T F A Q H M A H K  
1036 ctggttcaggaacagccaagaagctactgactcagaaaagggttgag  
L F R N S Q E A T D S E K V E  
1081 ccaaaggtacaggattatgctaacactgaaatacctcagccaggg  
P K V Q D Y A N T E I P Q P G  
1126 gaacataagaaaaccgaagaaaccaaactccagaaactgaaatc  
E H K K T E E T K P P E T E I  
1171 tcagagccatgtgaagaggatactgggttttctaaaagctgaaata  
S E P C E E D T G F L K A E I  
1216 tctcagccactggaactagaaaacaatcctcctaaaagtaagaat  
S Q P L E L E N N P P K S K N  
1261 tcggttcctgctattaagggttga 1284  
S V P A I K G \*

## 5. Verwendeten Oligonucleotide

Dioxy1H	5'-GAN TGG GGN RTN WTN CAN KTN RYN RAY CAY GG-3'
Dioxy2H	5'-CCG GGT TCT GGA AAG TTG C-3'
Dioxy1R	5'-TCN GTR TGN SYN WYN AMN CCY AAN TCN GG-3'
Oligo-(dT)	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN-3'
Oligo-(dT)-Anchor	5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTY-3'
PCR-Anchor	5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C-3'
AA-Primer	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGN NGG GNN GGG NNG-3'
AUA-Primer	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
<i>EaputFLS_3.1</i>	5'-AAA GTC CTG GAG AGG ATG G-3'
<i>EaputFLS_3.2</i>	5'-TGG CTT AGG AAC TCC ATG G-3'
<i>EaputFLS_5.1</i>	5'-GAT TAC CAA GAG GCC ATA TCC-3'
<i>EaputFLS_5.2</i>	5'-GGG AAA CGT TAG GCC TTC C-3'
<i>EaputFLS_5.3</i>	5'-CCA TTC ATG TAA GAG ATA CTA CC-3'
<i>EaputFLS_EtoE_F</i>	5'-TAG TAT GGC AGA AGT AGT TGC-3'
<i>EaputFLS_EtoE_R</i>	5'-CTA TAT CTC CTT GGA ACT TCC-3'
<i>EaputFLS_R_ohneS</i>	5'-ATG AGG GTC CTC ACA AGG-3'
<i>EaFLS22.1f</i>	5'-ATC ATG TTG CCC CCC TTC AC-3'
<i>EaFLS22.1rMS</i>	5'-TCA ATA GAA ATT TGT GAG GAC CTT CTT C-3'
<i>EaFLS22.1rOS</i>	5'-ATA GAA ATT TGT GAG GAC CTT CTT CAC-3'
ANS 3.1	5'-GAR TGG GAR GAY TAY TTY TTY-3'
ANS 3.2	5'-GAA GCY CAY ACN GAY GTV AGY-3'
<i>PcANS_5.1</i>	5'-CTG TAC CTT TGG CTC AAC C-3'
<i>PcANS_5.2</i>	5'-CAT ATG CTG AGC AAA GGT ACG-3'
<i>PcANS_5.3</i>	5'-CCT GTG AAA AAT ACT TTT ATA CTT CC-3'

<i>PcANS_5.6</i>	5'-GCT TTC TCC TCA GGA TAA ACA AGG-3'
<i>PcANS_5.7</i>	5'-GTC TTC CCA TTC AAG C-3'
<i>PcANS_5.8</i>	5'-GCG TTG TTG GCT AGC TTG C-3'
<i>PcANSfullneu_f</i>	5'-ACA ATG GTG ACA ACC ACC TCA G-3'
<i>PcANSfull_r</i>	5'-CTG GAA ATC AAC CCT TAA TAG CAG G-3'
<i>PcANSohneStop_r</i>	5'-ACC CTT AAT AGC AGG AAC CGA ATT C-3'
<i>PcANS1Hduet</i>	5'-AGA TCT AAT GGT GAC AAC CAC CTC AG-3'
<i>PcANS1RduetMS</i>	5'-CTC GAG TCA ACC CTT AAT AGC AGG AAC C-3'
<i>PcANS1HpQE70</i>	5'-CCA TGG TGA CAA CCA CCT CAG-3'
<i>PcANS1RpQE60MS</i>	5'-AGA TCT TCA ACC CTT AAT AGC AGG AAC C-3'
<i>PcANS_pYES2_f</i>	5'-AAC ACA ATG TCT ACA ACC ACC TCA G
<i>DFRdegH1</i>	5'-CAA AGG ATC CGA GAA TGA AGT RAT HAA RCC-3'
<i>DFRdegR1</i>	5'-AGA AGG ATC CAA AAT ACA TCC ATC CNG TCA T-3'
<i>18SrRNAfor</i>	5'-AGG AAT TGA CGG AAG GGC AC-3'
<i>18SrRNArev</i>	5'-GCA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'
<i>PcCHS1H</i>	5'-AAA ATG GCA AAT CAT CAT AAT GCA G-3'
<i>PcCHS1R</i>	5'-GGA ACA ACT TCA GTG AGT AAA AG-3'
<i>PcFHT1H</i>	5'-CAA TGG CTC CTT CAA CTC TCA CTG C-3'
<i>PcFHT1R</i>	5'-CCC ATA GTC TGA TAA CAA ACT TTG GAA GC-3'
<i>PcFNS1H</i>	5'-CAA TGG CTC CTA CAA CAA TAA CTG C-3'
<i>PcFNS1R</i>	5'-CTC CAT AGT ATT CAG CGT TTA GAC ATG G-3'
<i>PcFLS1H</i>	5'-AAT GGA GGT TGA AAG AGT GCA AGC-3'
<i>PcFLS1R</i>	5'-CCG GAT GAA TCA TTG AGG-3'
<i>Pc4CL1H</i>	5'- CAT AAT GGG AGA CTG TGT AGC -3'
<i>Pc4CL1R</i>	5'- GAT TAC TTA TTT GGG AAG ATC ACC -3'

## 6. Quellen und Accession-Nr. der verwendeten Aminosäure-Sequenzen in den Phylogenie-Analysen

Stammpflanze	Enzym	Accession No.	Beichnung in Alignment	Publikation
<i>Petroselinum crispum</i>	ANS		PcANS	Bredebach et al. Unpublished
<i>Daucus carota</i>	ANS	AAD56581	DcANSAAD56581	Hirner et al., Plant Sci. 161 (2), 315-322 (2001)
<i>Fragaria x ananassa</i>	ANS	AAU12369	FaANS AAU12369	Almeida et al., Arch. Biochem. Biophys. 465 (1), 61-71 (2007)
<i>Malus x domestica</i>	ANS	AAZ7934	MdANS AAZ7934	Fischer et al., unpublished
<i>Pyrus communis</i>	ANS	ABB70119	PcANS ABB70119	Fischer et al., Trees (Berl. West) 21 (5), 521-529 (2007)
<i>Camellia sinensis</i>	ANS	AAV88087	CsANSAAV88087	Singh et al., unpublished
<i>Callistephus chinensis</i>	ANS	AAB66560	CaANSAAB66560	Henkel and Forkmann, 1997
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	ANS	ACF75873	CmANSACF75873	Hu et al., unpublished
<i>Gerbera x hybrid</i>	ANS	AAY15743	GhANSAAY15743	Chen et al., unpublished
<i>Brasica oleracea</i>	ANS	AAO73440	BoANSAAO73440	Shimada et al, 2003
<i>Glycine max</i>	ANS	AAR26525	GmANSAAR26525	Huang and Wang, unpublished
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ANS	1GP5A	AtANS1GP5A	Saito et al., Plant J. 17 (2), 181-189 (2005)
<i>Ginkgo biloba</i>	ANS	ACC66092	GbANSACC66092	Xu et al., Mol. Cells 26 (6) (2008)
<i>Petroselinum crispum</i>	FLS	AAP57393	PcFLSAAP57393	Martens et al., Phytochemistry 58 (1), 43-46 (2001)
<i>Petunia x hybrid</i>	FLS	CAA80264	PhFLSCAA80264	Holton et al., Plant J. 4 (6), 1003-1010 (1993)
<i>Nicotiana tabacum</i>	FLS	ABE28017	NtFLSABE28017	Huang et al., unpublished
<i>Solanum tuberosum</i>	FLS	CAA63092	StFLSCAA63092	van Eldik et al., Plant j. 11 (1), 105-113 (1997)
<i>Antirrhinum majus</i>	FLS	ABB53382	AmFLSABB53382	Schwinn et al., Plant Cell 18 (4), 831-851 (2006)
<i>Allium cepa</i>	FLS	AAT68476	AcFLSAAT68476	Shen et al., unpublished
<i>Glycine max</i>	FLS		GmFLSBAF31231	Takahashi et al., Plant Mol. Biol. 63 (1), 125-135 (2007)

Stammpflanze	Enzym	Accession No.	Bezeichnung in Alignment	Publikation
<i>Fragaria x ananassa</i>	FLS	AAZ78661	FaFLS AAZ78661	Almeida et al., Arch. Biochem. Biophys. 465 (1), 61-71 (2007)
<i>Rosa x hybrid cultivar</i>	FLS	BAC66478	RhFLS BAC66478	Tanaka and Yonekura, unpublished
<i>Clitoria ternatea</i>	FLS	BAF49296	CtFLS BAF49296	Noda, unpublished
<i>Malus domestica</i>	FLS	AAX89401	MdFLS AAX89401	Halbwirth et al., Plant sci. 171 (2), 194-205 (2006)
<i>Pyrus communis</i>	FLS	ABB70118	PcFLS ABB70118	Fischer et al., Trees (Berl. West) 21 (5), 521-529 (2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FLS	AAB41594	AtFLS AAB41594	Harmann und Weisshaar, unpublished
<i>Ginkgo biloba</i>	FLS	AAS21058	GbFLS AAS21058	Pang et al., unpublished
<i>Nicotiana suaveolens</i>	ACCO	ABI95858	NsACCO ABI95858	Roeder et al., Plant Mol. Biol. 70 (5), 535-546 (2009)
<i>Brassica oleracea</i>	ACCO	AAT78420	BoACCO AAT78420	Chen et al., Yi Chuan Xue Bao 32 (7), 764.769 (2005)
<i>Malus domestica</i>	ACCO	AAB94031	MdACCO AAB94031	Nam and Kim, unpublished
<i>Solanum lycopersicum</i>	ACCO	BAA34924	SlACCO BAA34924	Nakatsuka et al., Plant Physiol 118 (4), 1295-1305 (1998)
<i>Musa acuminata</i>	ACCO	AAG43057	MaACCO AAG43057	Do et al., J. Agric. Food Chem. 53 (21), 8239-8247 (2005)
<i>Prunus ameniaca</i>	ACCO	AAC33524	PaACCO AAC33524	Mbeguie et al., Physiol. Plantarum 105 (2), 294-303 (1999)
<i>Rumex plaustris</i>	ACCO	AAB97368	RpACCO AAB97368	Vriezen et al., Plant Physiol. 121 (1), 189-196 (1999)
<i>Medicago sativa</i>	ACCO	ABF61805	MsACCO ABF61805	Feng et al., unpublished
<i>Solanum tuberosum</i>	ACCO	AAK68076	StACCO AAK68076	Nie et al., Genome 45 (5), 905-913 (2002)
<i>Trifolium repens</i>	ACCO	AAD28196	TrACCO AAD28196	Hunter et al., Plant Physiol. 120 (1), 131-142 (1999)
<i>Zea mays</i>	ACCO	AAM20910	ZmACCO AAM20910	Alexandrov et al., Plant Mol. Biol. 69 (1-2), 179-194 (2009)
<i>Fragaria x ananassa</i>	ACCO	AAU10090	FaACCO AAU10090	Kiss et al., Book of Abstracts P1-7: 34; 7th International Symposium on Plant Hormone Ethylene, Pisa, Italy 2006

Stammpflanze	Enzym	Accession No.	Bezeichnung in Alignment	Publikation
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GA-200	AAC39313	AtGA200 AAC39313	Xu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (14), 6640-6644(1995)
<i>Dasypyrum villosum</i>	GA-200	ACU40946	DvGA200 ACU40946	Cai et al., unpublished
<i>Curcubita maxima</i>	GA-200	AAB64345	CmGA200 AAB64345	Lange et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (18), 8552-8556 (1994)
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	GA-200	ABQ17965	CmGA200 ABQ17965	Huh et al., unpublished
<i>Lolium perenne</i>	GA-200	AAG43042	LpGA200 AAG43042	Xu et al., unpublished
<i>Daucus carota</i>	GA-200	BAD30033	DcGA200 BAD30033	Mitsuhashi et al., Biosci. Biotech. Bioch. 67 (11), 2438-2447 (2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GA-30	NP_178149	AtGA30 NP_178149	unpublished
<i>Populus tremula x tremuloides</i>	GA-30	AAR12160	PtGA30 AAR12160	Israelsson et al., Plant Physiol. 135 (1), 221-230 (2004)
<i>Daucus carota</i>	GA-30	BAD30036	DcGA30 BAD30036	Mitsuhashi et al., Biosci. Biotech. Bioch. 67 (11), 2438-2447 (2003)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GA-20	AAM62762	AtGA20 AAM62762	Haas et al., Genome Biol. 3 (6) (2002)
<i>Nerium oleander</i>	GA-20	AAT72916	NoGA20 AAT72916	Ubeda-Tomas et al., J. Plant Growth Regul. 25 (1), 52-68 (2006)
<i>Zea mays</i>	GA-20	NP_00115205	ZmGA20 NP_00115205	Bloduc and Hake, Plant Cell 21 (6), 1647-1658 (2009)
<i>Daucus carota</i>	GA-20	BAD30039	DcGA20 BAD30039	Mitsuhashi et al., Biosci. Biotech. Bioch. 67 (11), 2438-2447 (2003)
<i>Ananas comosus</i>	GA-20	ACN30002	AcGA20 ACN30002	Zhang et al., 2009
<i>Petunia x hybrid</i>	GA-20	ACY01189	PhGA20 ACY01189	Deng et al., unpublished
<i>Psium satvum</i>	GA-20	AAF13735	PsGA20 AAF13735	Martin et al., Plant Physiol. 121 (3), 775-781 (1999)



Stammpflanze	Enzym	Accession No.	Bezeichnung in Alignment	Publikation
<i>Hyoscyamus niger</i>	H6H	AAA33387	HnH6H AAA33387	Matsuda et al., J. Biol. Chem. 266 (15), 9460-9464 (1991)
<i>Brugmansia candida</i>	H6H	ACB40931	BcH6H ACB40931	Cardillo et al., unpublished
<i>Datura metel</i>	H6H	AAQ04302	DmH6H AAQ04302	Pramod and Javabaskaran, unpublished
<i>Atropa baetica</i>	H6H	ABR15749	AbA6H ABR15749	El Jaber-Vazdekis et al., Plant Physiol. Biochem. 47 (1), 20-25 (2009)
<i>Anisodus acutangulus</i>	H6H	ABM74185	AaH6H ABM74185	Kai et al., J. Biochem. Mol. Biol. 40 (5), 715-722 (2007)
<i>Atropa belladonna</i>	H6H	BAA78340	AbH6H BAA78340	Suzuki et al., Plant Mol. Biol. 40 (1), 141-152 (1999)
<i>Anisodus tanguticus</i>	H6H	AAQ75700	AtH6H AAQ75700	Liu et al., Planta Med. 71 (3), 249-253 (2005)
<i>Catharanthus rosea</i>	D4H	AAB97311	CrD4H AAB97311	Vazquez-Flota et al., Plant Mol. Biol. 34 (6), 935-948 (1997)
<i>Zea mays</i>	P4H	NP_00115003	ZmP4H NP_001150030	Alexanodrov, et al., Plant Mol. Biol. 69 (1-2), 179-194 (2009)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	P4H	AAT84604	DcP4H AAT84604	Owen and Kalaitzis, unpublished
<i>Nicotiana tabacum</i>	P4H	BAD07294	NtP4H BAD07294	Yuasa et al., Plant J. 41 (1), 81-94 (2005)
<i>Petroselinum crispum</i>	FNS I	AAP57393	PcFNSI AAP57393	Martens et al., Phytochemistry 58 (1), 43-46 (2001)
<i>Angelica archangelica</i>	FNS I	ABG78793	AaFNSI ABG78793	Gebhardt et al., Plant Physiol. 144 (3), 1442-1454 (2007)
<i>Aethusa cynapium</i>	FNS I	ABG78791	AcFNSI ABG78791	Gebhardt et al., Plant Physiol. 144 (3), 1442-1454 (2007)
<i>Cuminum cyminum</i>	FNS I	ABG78790	CcFNSI ABG78790	Gebhardt et al., Plant Physiol. 144 (3), 1442-1454 (2007)
<i>Conium maculatum</i>	FNS I	ABG78795	CmFNSI ABG78795	Gebhardt et al., unpublished
<i>Daucus carota</i>	FNS I	AAX21542	DcFNSI AAX21542	Gebhardt et al., unpublished
<i>Apium graveolens</i>	FNS I	AAX21537	AgFNSI AAX21537	Gebhardt et al., Phytochemistry 66 (11), 1273-1284 (2005)

Stammpflanze	Enzym	Accession No.	Bezeichnung in Alignment	Publikation
<i>Ginkgo biloba</i>	FHT	AAU93347	GbFHT AAU93347	Shen et al., Biosci. Rep. 26 (1), 19-29 (2006)
<i>Camellia sinensis</i>	FHT	AAT68774	CsFHT AAT68774	Singh et al., Tree Physil. 28 (9), 1349-1356 (2008)
<i>Daucus carota</i>	FHT	AAD56577	DcFHT AAD56577	Hirner et al., Plant Sci. 161 (2), 315-322 (2001)
<i>Iris x hollandica</i>	FHT	BAF44477	lhFHT BAF44477	Yoshihara et al., unpublished
<i>Glycine max</i>	FHT	AAT94365	GmFHT AAT94365	Ralston et al., Plant Physiol. 137 (4), 1375-1388 (2005)
<i>Persea americana</i>	FHT	AAC97525	PaFHT AAC97525	Ardi et al., Plant Physiol. 118 (4), 1535 (1998)
<i>Allium cepa</i>	FHT	AAO63022	AcFHT AAO63022	Kim et al., unpublished
<i>Pyrus communis</i>	FHT	AAM18084	PcFHT AAM18084	Shaohua and Dasheng, unpublished
<i>Malus x domestica</i>	FHT	AAD26206	MdFHT AAD26206	Lee et al., unpublished
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FHT	AAC68584	AtFHT AAC68584	Wisman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (21), 12432-12437
<i>Fragaria x ananassa</i>	FHT	AAU04792	FaFHT AAU04792	Almeida et al., Arch. Biochem. Biophys. 465 (1), 61-71 (2007)
<i>Petroselinum crispum</i>	FHT	AAP57394	PcFHT AAP57394	Martens et al., FEBS Lett. 544 (1-3), 93-98 (2003)
Outgroup				
<i>Homo sapiens</i>	P4H	NP_808808	HsP4H NP_808808	Koivunen et al., J. Biol. Chem. 282 (42), 30544-30552

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Molekularbiologische und Biochemische Untersuchungen zu 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen in *Equisetum arvense* L. und *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman & A. W. Hill“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Wenden, den 18.12.2012

.....  
(Miriam Bredebach)

## Lebenslauf

Name: Bredebach, geb. Hundt

Vorname: Miriam

Geburtsdatum: 01.05.1982

Geburtsort: Olpe

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Verheiratet

Ehemann: Patrick Bredebach  
geb. am 18.02.1982  
wissenschaftl. Angestellter der Universität Siegen

Abitur: 2001, St. Franziskus-Gymnasium Olpe

Studium: Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn von Oktober 2001 bis September 2005

Staatsexamina: 1. Staatsexamen nach AppO für Apotheker absolviert im Sommersemester 2003  
2. Staatsexamen nach AppO für Apotheker absolviert im Sommersemester 2005  
3. Staatsexamen nach AppO für Apotheker absolviert am 28.11.2006

Approbation zur Apothekerin: Dezember 2006

Promotion: Vom 01.01.2007 bis zum 31.03.2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Matern am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Berufliche Tätigkeit: Seit April 2010 angestellte Apothekerin der Kath. Hospitalgesellschaft Südwestfalen gGmbH, St. Martinus-Hospital in Olpe